



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
NÚCLEO DE SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

LEDA FABIÉLEN TEIXEIRA

EFEITOS LOCAIS E SISTÊMICOS DE BdipTX-I, UMA NOVA FOSFOLIPASE A₂
Lys-49 ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops diporus*

PORTO VELHO-RO

2014

LEDA FABIÉLEN TEIXEIRA

**EFEITOS LOCAIS E SISTÊMICOS DE BdipTX-I, UMA NOVA FOSFOLIPASE A₂
Lys-49 ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops diporus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental da Fundação Universidade Federal de Rondônia - UNIR para obtenção de Título de Mestre em Biologia Experimental.
Orientadora: Dr.^a JULIANA P. ZULIANI

PORTO VELHO-RO

2014

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

T266e

Teixeira, Leda Fabiélen

Efeitos locais e sistêmicos de BdipTX-I, uma nova fosfolipase A₂ Lys-49 isolada do veneno da serpente *Bothrops diporus*. / Leda Fabiélen Teixeira. Porto Velho, Rondônia, 2014.
80f.: il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Juliana Pavan Zuliani

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Núcleo de Saúde (NUSAU), Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2014.

1. *Bothrops diporus*. 2. Fosfolipases A₂. 3. Miotoxicidade. 4. Efeito sistêmico. I. Fundação Universidade Federal de Rondônia. II. Título.

CDU: 598.115

Bibliotecária Responsável: Eliane Gemaque / CRB 11- 549

LEDA FABIÉLEN TEIXEIRA

EFEITO LOCAL E SISTÊMICO DE BdipTX-I, UMA NOVA FOSFOLIPASE A₂ Lys-49 ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops diporus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental da Fundação Universidade Federal de Rondônia - UNIR para obtenção de Título de Mestre em Biologia Experimental.
Orientadora: Dr.^a JULIANA P. ZULIANI

Aprovado em _____ de _____ de 2014.

BANCA EXAMINADORA

Dr.^a Juliana P. Zuliani

UNIR; Instituto de Pesquisas em Patologias Tropicais, IPEPATRO/FIOCRUZ-RO

Dr. Luiz Fernando Moreira Izidoro
Universidade Federal de Uberlândia-UFU

Dr. Cesar Luiz Guimarães
Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais-IBAMA/AP

*À minha querida mãe que me
deu a vida, me criou com toda a
dedicação que pôde e, acima de tudo,
sempre me incentivou a estudar.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a minha família.

À minha orientadora, Dr.^a Juliana pela oportunidade e confiança.

Ao Dr. Andreimar por ter cedido o veneno e o espaço no CEBio para realização do isolamento das proteínas.

A todos os colegas do CEBio que colaboraram com a realização desse estudo: Juliana Sobrinho, George, Kayano, Rodrigo Simões e Rafaela.

A todas as colegas dos Laboratórios de Bioquímica e Cultivo Celular: Jéssica, Nery, Sulamita e Adriana.

À minha chefe e amiga Daniele pelo incentivo e apoio que me permitiram cursar o mestrado.

Ao ex-diretor do Departamento de Vigilância Sanitária, Ronald Passos da Silva, pelo apoio.

A todos os amigos que me incentivaram durante essa jornada: Isadora, Ana Gleice, Márcio e Luzia.

Aos meus amigos Letícia e Onassis pelo apoio durante realização dos experimentos.

Um agradecimento especial aos meus amigos Leandro Flores, Michele e Letícia que, mais que amigos, foram meus companheiros na realização deste trabalho, prestando sempre apoio, carinho e incentivo, obrigada por tudo meus lindos.

E a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

Ao CNPQ e FINEP.

RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo isolar as fosfolipases A₂ (PLA₂) básicas do veneno da serpente *Bothrops diporus* (VBd), avaliar e comparar as atividades edematogênica e miotóxica, bem como, os efeitos sistêmicos provocados tanto pela PLA₂ isolada quanto pelo VBd em camundongos Swiss. Para tanto, o VBd foi submetido à duas etapas cromatográficas, sendo uma de troca iônica e uma de fase reversa. As frações obtidas foram analisadas quanto ao peso molecular por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12,5% e quanto à atividade enzimática por hemólise indireta e atividade sobre o ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi) benzóico (4N3OAB). Desse processo, foram obtidas duas PLA₂, sendo uma Asp-49 (BdipTX-II) e uma Lys-49 (BdipTX-I). BdipTX-I e VBd foram então avaliados quanto à atividade biológica: efeitos locais (edema e miotoxicidade) e sistêmicos (efeitos sobre as funções hepática e renal). Os resultados obtidos mostraram que a atividade edematogênica, avaliada considerando-se o aumento percentual no volume das patas inoculadas com VBd ou BdipTX-I com relação as patas controle, foi significativo em todas as doses testadas tanto para BdipTX-I quanto para VBd, observando-se um aumento significativo do edema a partir de 0,5 hora nas duas doses de VBd (5 e 20 µg/pata) e na de 20 µg/pata de BdipTX-I, com pico na 1 hora e decaindo nas 24 horas, efeito não observado na dose de 20 µg/pata de VBd. Quanto a miotoxicidade, avaliada pelo aumento dos níveis séricos de creatina quinase (CK), CK-MB e lactato desidrogenase (LDH), os dados obtidos mostraram que o efeito de VBd é mais proeminente do que o de BdipTX-I. Os efeitos sistêmicos causados a partir da lesão local foram avaliados pela dosagem de marcadores laboratoriais específicos. Sendo utilizados: AST, ALT, GGT e FAL para avaliar a função hepática; níveis de ureia e creatinina séricos e urinários, excreção de proteínas e cálcio na urina para avaliar o dano renal. Lesões cardíacas e hepáticas não foram confirmadas, apesar de ter havido elevações nos níveis de LDH e AST. Contudo, BdipTX-I e VBd foram capazes de induzir alterações renais no modelo experimental testado, ocasionando proteinúria (induzida tanto por BdipTX-I quanto por VBd), além de uremia (presente no efeito de VBd, mas não de BdipTX-I). Deste modo, estabelece-se que as ações sistêmicas da proteína e do veneno ocorrem de forma diferenciada. Fato que, provavelmente, está relacionado aos outros componentes presentes no VBd. Este estudo além de ter propiciado o isolamento de duas PLA₂ inéditas para o VBd, também traz informações adicionais acerca dos efeitos sistêmicos induzidos tanto pelo veneno quanto pela PLA₂ isolada.

Palavras chave: *Bothrops diporus*. Fosfolipases A₂. Edema, Miotoxicidade, Efeito sistêmico.

ABSTRACT

This study aimed to isolate the basic phospholipase A₂ (PLA₂) from the venom of *Bothrops diporus* (VBd), to evaluate and compare the edema and myotoxic activities, as well as the systemic effects caused by both the PLA₂ isolated as by the VBd in Swiss mice. For this purpose the VBd was submitted to the two chromatographic steps being a ion exchange and reverse phase. The fractions obtained were analyzed as to molecular weight by SDS-PAGE on 12.5% polyacrylamide gel and the enzymatic activity by indirect hemolysis and activity on the 4-nitro-(3-octanoyloxy) benzóico (4N3OAB) acid. In this process, two PLA₂ were obtained, being an Asp-49 (BdipTX-II) and a Lys-49 (BdipTX-I). BdipTX-I and VBd were then evaluated for biological activity: local (edema and myotoxicity) and systemic (effects on the liver and kidney function) effects. The results showed that the edematogenic activity, evaluated considering the percentage increase in the volume of inoculated feet with VBd or BdipTX-I regarding the control paws, was significant at all doses tested for BdipTX-I and for both VBd, noting a significant increase in edema after 0.5 hour on of VBd two doses (5 and 20 µg/paw) and on the 20 µg/paw BdipTX-I, with a peak at 1 hour and 24 hours decreasing effect not observed at a dose of 20 mg/paw of VBd. As for myotoxicity, evaluated by the increased serum levels of creatine kinase (CK), CK-MB and lactate dehydrogenase (LDH), the data showed that the effect of VBd is more prominent than that of BdipTX-I. Systemic effects as from the injury site were evaluated by measurement of specific laboratory markers. Being used: AST, ALT, GGT and ALP to assess liver function; urea levels and serum and urinary creatinine and protein excretion of calcium in urine to assess renal damage. Cardiac and hepatic lesions were not confirmed, although there were elevated levels of LDH and AST. However, BdipTX-I and VBd were able to induce renal changes in experimental models tested, resulting in proteinuria (induced by either BdipTX-I as a VBd), and uremia (VBd effect present in, but not BdipTX-I). In this way, it is established that the systemic actions of the venom protein and occur differently. This fact is probably related to other components present in VBd. This study besides having undertaken the isolation of two novel PLA₂ for VBd also provides additional information about the systemic effects induced both by the venom as PLA₂ isolated.

Keywords: *Bothrops diporus*. Phospholipase A₂. Edema. Myotoxicity. Systemic effect.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Bothrops diporus</i> .	16
Figura 2. Modelo esquemático da ação das PLA ₂ .	18
Figura 3. Representação tridimensional sPLA ₂ vs Asp-49 purificada de <i>Daboia russelli pulchella</i> .	22
Figura 4. Mecanismo de ação das sPLA ₂ sv Asp-49.	23
Figura 5. Representação tridimensional sPLA ₂ vs Lys-49 (BthTX I) de <i>Bothrops jararacussu</i> .	24
Figura 6. Fracionamento do VBd por cromatografia de troca iônica.	35
Figura 7. Perfil eletroforético do VBd e das frações obtidas por cromatografia de troca iônica.	36
Figura 8. Purificação de BdipTX-I por cromatografia de fase reversa.	37
Figura 9. Isolamento de BdipTX-II por cromatografia de fase reversa.	38
Figura 10. Eletroforese das PLA ₂ s isoladas do VBd.	39
Figura 11. Atividade hemolítica indireta do VBd, frações e toxinas isoladas.	40
Figura 12. Atividade fosfolipásica do VBd, BdipTX-I e BdipTX-II sobre o 4N3OAB.	41
Figura 13. Alinhamento múltiplo da sequência dos primeiros 68 aminoácidos de BdipTX-I com outras PLA ₂ de venenos de serpentes.	43
Figura 14. Atividade edematogênica do VBd e da BdipTX-I em camundongos <i>Swiss</i> .	45
Figura 15. Efeito miotóxico do VBd e da BdipTX-I em camundongos <i>Swiss</i> .	47
Figura 16. Efeito do VBd e da BdipTX-I sobre a função hepática de camundongos <i>Swiss</i> .	48
Figura 17. Efeito do VBd e da BdipTX-I sobre a função renal de camundongos <i>Swiss</i> .	50

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Divisão das PLA ₂	20
TABELA 2 - Sequência parcial de aminoácidos de BdipTX-I.	42
TABELA 3 - Marcadores de lesão renal alterados pelo VBd e BdipTX-I.	49
TABELA 4 - sPLA ₂ Lys-49 isoladas do veneno de serpentes.	52
TABELA 5 - Miotoxicidade de algumas sPLA ₂ Lys-49 isoladas do veneno de serpentes.....	57

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Ácido araquidônico

ALT – Alanina amino transferase

ANOVA – Análise de variância

ARDS – *Acute respiratory distress syndrome*/Síndrome do Desconforto Respiratório Agudo

Asp - Aspartato

ATP – Adenosina trifosfato

BdipTX-I – Toxina I de *B. diporus*

BdipTX-II – Toxina II de *B. diporus*

CEbio – Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas a Saúde

CK – Creatina quinase

CLAE – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

cPLA₂ – Fosfolipases A₂ citosólicas

D.O. – Densidade óptica

DCM – dose coagulante mínima

FAL – Fosfatase Alcalina

GGT – Gama Glutamil Transferase

His- Histidina

IL-1 β – Interleucina 1 β

IL-6 – Interleucina 6

iPLA₂ – Fosfolipases A₂ independentes de Ca²⁺

LAAO – L-aminoácido oxidase

LDH – Desidrogenase Láctica

Lys – Lisina

MS – Ministério da Saúde

NOAB – ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi) benzóico

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPD – O-phenylenediamine

PAF – AH – Acetil hidrolases do fator ativador de plaquetas

PAF – Fator de ativação de plaquetas

PAF-AH – Acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas

PBS – Solução tampão fosfato salina

PLA₁ – Fosfolipases A₁

PLA₂ – Fosfolipases A₂

PLC – Fosfolipases C

PLD – Fosfolipases D

PLs – Fosfolipases

RT – Reagente de trabalho

SBH – Sociedade Brasileira de Herpetologia

Ser - Serina

sPLA₂ – Fosfolipases A₂ secretada

sPLA₂vs – Fosfolipases A₂ secretadas de venenos de serpentes

TCA – ácido tricloroacético

TFA - Ácido trifluoracético

TGO – Transaminase Glutâmico Oxálica

TGP – Transaminase Glutâmico Pirúvica

TNF – Fator de Necrose Tumoral

VBd – Veneno de *Bothrops diporus*

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 ACIDENTES OFÍDICOS	13
1.2 VENENOS DE SERPENTES DO GÊNERO <i>Bothrops</i>	14
1.3 <i>Bothrops diporus</i> (COPE, 1862)	15
1.4 FOSFOLIPASES A ₂	17
2 OBJETIVOS	26
2.1 OBJETIVO GERAL	26
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 ISOLAMENTO DAS PLA ₂ s DE <i>B. diporus</i>	27
3.1.1 Venenos	27
3.1.2 Etapas cromatográficas	27
3.1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida	28
3.1.4 Dosagem proteica	28
3.1.5 Atividade fosfolipásica indireta	29
3.1.6 Atividade fosfolipásica direta	29
3.2 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE BdipTX-I	30
3.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA – EFEITO LOCAL E SISTÊMICO	30
3.3.1 Animais utilizados nos experimentos	30
3.3.2 Obtenção das amostras de plasma e urina	30
3.3.3 Edema	31
3.3.4 Atividade miotóxica	31
3.3.5 Efeitos sobre a função hepática	32
3.3.6 Efeitos sobre a função renal	33
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA	34
4 RESULTADOS	35
4.1 ISOLAMENTO DAS PLA ₂ s DE <i>B. diporus</i>	35
4.1.2 Etapas Cromatográficas e eletroforéticas	35
4.1.3 Atividade fosfolipásica indireta	40
4.1.4 Atividade fosfolipásica direta	41

4.2 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE BdipTX-I-----	42
4.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DO VBd E DE BdipTX-I – EFEITOS LOCAIS E SISTÊMICOS -----	44
4.3.1 Edema-----	44
4.3.2 Atividade miotóxica-----	46
4.3.3 Efeitos sobre a função hepática-----	48
4.3.4 Efeitos sobre a função renal-----	49
5 DISCUSSÃO -----	51
6 CONCLUSÕES -----	64
REFERÊNCIAS -----	65

1 INTRODUÇÃO

1.1 ACIDENTES OFÍDICOS

Os acidentes ofídicos são ocasionados pela mordida e/ou picada de serpentes, as quais podem ou não ser peçonhentas, sendo que os casos mais graves envolvem aquelas que possuem peçonha. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), esses acidentes são considerados importantes problemas de saúde pública, particularmente em áreas rurais de países tropicais e subtropicais, da África, Ásia, Oceania e América Latina (OMS, 2013).

A OMS estima que pelo menos 5.000.000 casos de envenenamentos são provocados anualmente em todo o mundo por mordida de serpentes, com cerca de 125.000 óbitos. No entanto, presume-se que estes dados não sejam reais, em virtude da ineficácia dos sistemas de saúde dos países atingidos em realizar a notificação, com repasse de informações precisas acerca dos registros (WILLIAMS *et al.*, 2010; GUTIÉRREZ *et al.*, 2013; OMS, 2013). Assim, a partir de 2009, os acidentes ofídicos passaram a fazer parte da lista de doenças negligenciadas da OMS (WARRELL, 2010).

No Brasil, de acordo com dados do Ministério da Saúde (MS), em 2010 foram registrados 29.635 acidentes envolvendo serpentes, sendo 85% causadas por serpentes peçonhentas. Destas, aquelas pertencentes aos gêneros *Bothrops*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias* e *Rhinocerophis*, chamados de acidentes botrópicos, representam cerca de 90% dos acidentes (com letalidade de 0,31%), seguido dos crotálicos, causados pelo gênero *Crotalus* (7,7% com 1,87% de letalidade), laquéuticos, gênero *Lachesis* (1,4% com 0,95% de letalidade) e elapídicos, gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* (0,4% com 0,52% de letalidade) (BERNARDE, 2011).

A gravidade do acidente está relacionada com a espécie causadora, além de fatores como a composição do veneno e a idade do animal, dentre outros (GUTIÉRREZ *et al.*, 2006). A população mais atingida é composta por trabalhadores agrícolas, adultos e crianças, que vivem nas zonas rurais de países subdesenvolvidos (GUTIÉRREZ *et al.*, 2010).

O envenenamento, de um modo geral, provoca danos locais como edema, hemorragia e necrose do tecido muscular. Estes efeitos desenvolvem-se rapidamente após a mordida e, consequentemente, um atraso no acesso aos

serviços de saúde frequentemente resulta em dano tecidual que pode ocasionar invalidez permanente. Efeitos sistêmicos também ocorrem como neurotoxicidade, insuficiência respiratória, mioglobinemia, hipercalemia, insuficiência renal aguda, hemorragia cerebral, coagulação intravascular disseminada, choque cardiovascular provocado por hipovolemia, vasodilatação e efeitos diretos sobre o miocárdio (GUTIÉRREZ et al., 2006; DEL BRUTTO et al., 2012).

O tratamento é feito com soro antiofídico e é ativo contra a maioria dos efeitos sistêmicos, porém não há eficácia contra os danos locais, como a destruição dos tecidos (WARREL, 2010; ADUKAUSKIENE et al., 2011).

1.2 VENENOS DE SERPENTES DO GÊNERO *Bothrops*

Os venenos de serpentes são uma mistura complexa de peptídeos tóxicos e proteínas. Cerca de 90 a 95% do peso seco do veneno é composto de proteínas, com uma ampla variedade de atividades biológicas possuindo diferentes formas de agir, tanto sobre presas como em vítimas. As proteínas biologicamente ativas podem matar ou imobilizar a presa, bem como, ajudar no processo da digestão (QUEIROZ et al., 2008).

Os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* induzem, em geral, um quadro fisiopatológico complexo, caracterizado por efeitos sistêmicos como choque, ações proteolíticas, hemorrágicas, coagulantes e alterações locais imediatas, que são caracterizadas por edema acompanhado ou não de equimose, dor, mionecrose e abscesso que podem levar a amputação do membro acometido (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989; RIBEIRO e JORGE, 1990).

A variedade dos efeitos causados pelo veneno botrópico se deve à composição química diversificada dessas toxinas, que inclui cardiotoxinas, lectinas, inibidores e várias enzimas, como proteases, metaloproteinasas, fosfolipases, serinoproteases, fosfodiesterases, colinesterases, aminotransferases, L-aminoácido-oxidases (L-AAO), catalases, ATPases, hialuronidases, NAD nucleosidases e β -glucosaminidases (TU, 1996). Estas proteínas podem ser agrupadas em enzimáticas (fosfolipases, metaloproteases e serinoproteases) e não-enzimáticas (inibidores da agregação plaquetária, lectinas, desintegrinas e neurotoxinas) (CHIPPAUX et al., 1991; MATSUI et al., 2000).

Deste modo, os venenos das espécies do gênero *Bothrops* são alvo de várias investigações quanto à atividade biológica. De *Bothrops neuwiedi* já foram isoladas frações com ação miotóxica (LEITE et al., 1999), desintegrinas inibidoras da agregação plaquetária (FURLAN, 2010) e metaloproteinases que induzem a infiltração de células inflamatórias, aumento de creatina quinase (CK), Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 1- β (IL-1 β) e liberação de Fator de Necrose Tumoral α (TNF- α) (LOPES et al., 2009).

Do veneno de *Bothrops pauloensis* já foram isoladas e caracterizadas fosfolipases com atividade neuromuscular, neurotóxica, bactericida, edematogênica, lipossomal, fibrinogenolítica, coagulante e hemorrágica (SOARES et al., 2000; BORJA-OLIVEIRA et al., 2007; RANDAZZO-MOURA et al., 2008). Também foram isoladas metaloproteinases de atividade proteolítica, hemorrágica, fibrinogenolítica e coagulante (IZIDORO, 2003); e L-aminoácido-oxidase de ação leishmanicida e bactericida (RODRIGUES et al., 2009).

Sendo assim, o veneno de *Bothrops diporus* pode ser considerado uma fonte para extração de moléculas proteicas bioativas com potencial para diversas aplicações biotecnológicas.

1.3 *Bothrops diporus* (COPE, 1862)

Bothrops diporus pertencente à família Viperidae, que compreende atualmente 30 espécies, amplamente distribuídas pela América Central e do Sul. São conhecidas popularmente por jararaca, ouricana, jararacuços, urutu-cruzeiro, jararaca-do-rabo-branco, malha de sapo, patrona, surucucurana, combóia, caiçaca, dentre outras denominações. São caracterizadas por possuírem a cauda sem maiores modificações, geralmente com escamas subcaudais em pares, aparelho inoculador do tipo solenóglifo, cabeça triangular e fosseta loreal (BERNARDE, 2011). Habitam principalmente zonas rurais, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas, além de locais onde haja facilidade na proliferação de roedores. Possuem hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares e geralmente apresentam comportamento agressivo quando se sentem ameaçadas, deferindo botes sem produzir ruídos (BRASIL, 2013; CARDOSO et al., 2003).



Figura 1. *Bothrops diporus* (MINOLI et al., 2011).

Bothrops diporus pode ser encontrada no Paraguai, na Argentina e no Brasil. Habita preferencialmente os charcos, florestas semitropicais decíduas e os pampas (SILVA, 2004). No Brasil, é amplamente distribuída a partir do sudoeste até a região sul, sendo encontrada em uma variedade de habitats (MINOLI et al., 2011).

Esta serpente foi considerada durante muito tempo como uma subespécie do complexo *Bothrops neuwiedi*, do qual faziam parte sete subespécies com ampla distribuição nas Américas Central e do Sul, sendo estas: *Bothrops diporus*, *Bothrops mattogrossensis* (sinônimos: *B. neuwiedi bolivianus*), *Bothrops pubescens*, *B. neuwiedi* (sinônimos: *B. neuwiedi goyazensis*, *B. neuwiedi paranaensis*, *B. neuwiedi meridionalis* e *B. neuwiedi urutu*) *Bothrops lutzi* (sinônimos: *B. neuwiedi piauhyensis* e *B. neuwiedi iglesiasi*), *Bothrops pauloensis* e *Bothrops marmoratus* (Silva, 2008).

Entretanto, após análises filogenéticas, houve uma reclassificação e as subespécies foram elevadas à categoria de espécie, passando a fazer parte do gênero *Bothropoides* (FENWICK et al., 2009; BERNARDI, 2011). Esta denominação foi aceita pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (SBH) até 2011. Contudo, após um novo estudo realizado por Carrasco e colaboradores (2011), a espécie passou a ser denominada *Bothrops diporus* (BÉRNILS e COSTA, 2012).

Quanto ao veneno de *B. diporus*, diversas atividades já foram descritas. Em estudo realizado por Abreu e colaboradores (2007), foi investigada a ação de bloqueio neuromuscular indicando interferência com a neurotransmissão pós-sináptica do veneno de espécies do complexo *Bothrops neuwiedi* (*B. paranaensis*, *B.*

diporus e *B. goyazensis*). Também foram descritas atividades coagulante, hemorrágica, fibrinogenolítica e edematogênica para o veneno dessa espécie (PÉREZ et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2011). A ação citotóxica em células musculares esqueléticas da linhagem C2C12 também foi investigada, indicando a morte celular por apoptose (BUSTILLO et al., 2009). Além disso, três fosfolipases A₂ ácidas (P-1, P-2 e P-3) foram isoladas do veneno de *B. diporus* e apresentaram atividade edematogênica e citotóxica (DANIELE et al., 1997). E outras duas fosfolipases A₂ ácidas (*BdsPLA₂-I* e *BdsPLA₂-II*) também foram obtidas por clonagem e expressão de ácidos desoxirribonucleicos complementares (cDNAs) obtidos a partir de ácidos ribonucleicos mensageiros (mRNAs) extraídos das glândulas produtoras de veneno da serpente (QUARTINO et al., 2012). Até o presente estudo, as PLA₂ básicas não haviam sido isoladas.

1.4 FOSFOLIPASES A₂

As fosfolipases (PLs) são enzimas que degradam fosfolipídeos e ocorrem em diversos organismos animais e vegetais. Elas são denominadas A₁ (PLA₁), A₂ (PLA₂), C (PLC) e D (PLD), de acordo com a posição em que realizam a clivagem hidrolítica de seus substratos (BALSIND et al., 1999). As fosfolipases A₂ (PLA₂) ou fosfatidil-acil-hidrolases (EC 3.1.1.4) são enzimas que catalisam a hidrólise da ligação acil-éster na posição *Sn*-2 de fosfolipídeos de membrana, produzindo ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos (BALSINDE et al., 1999; SIX e DENNIS, 2000) (Figura 2).

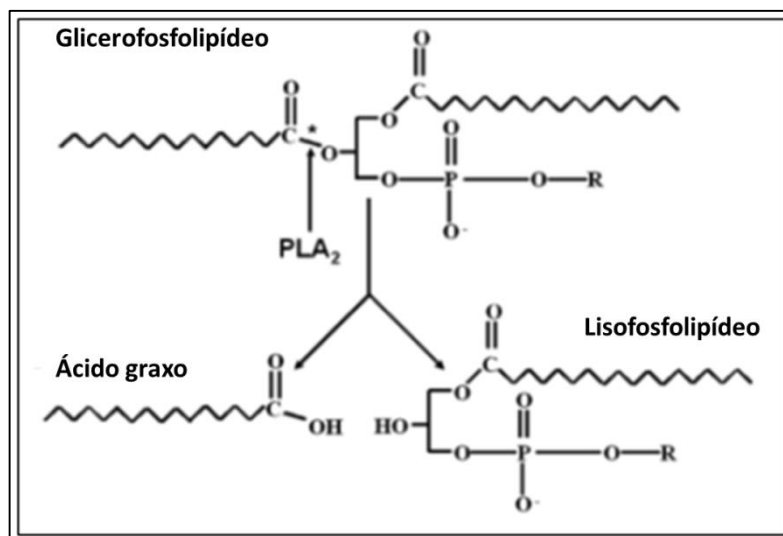


Figura 2. Modelo esquemático da ação das PLA₂. A PLA₂ faz a hidrólise da ligação Sn-2 do glicerofosfolípido resultando na liberação de ácido graxo e lisofosfolídeos (CUMMINGS, 2007 com adaptações).

As PLA₂ desempenham um importante papel em muitos processos biológicos como digestão e metabolismo, defesa do hospedeiro e transdução de sinais. Os ácidos graxos lançados pela ação das PLA₂, dentre os quais está o ácido araquidônico (AA), podem funcionar como reserva de energia, mensageiros secundários e precursores de eicosanoides como prostaglandinas (derivadas da ação das ciclooxygenases sobre o AA), leucotrienos e tromboxanos (derivados da ação das lipoxigenases sobre o AA). Estes, por sua vez, podem participar de numerosas funções, tais como a regulação do sono, resposta imune, inflamação e percepção da dor. Os lisofosfolídeos, por outro lado, estão envolvidos na sinalização celular e remodelagem da membrana (DENNIS, 1994; ARNI e WARD, 1996; BALSINDE et al., 1999; SIX e DENNIS, 2000; BALSINDE et al., 2002).

Além disso, estudos apontam cada vez mais o envolvimento dessas enzimas em processos fisiológicos e patológicos tais como a reprodução, transdução neuronal, artrite, infarto do miocárdio, arteriosclerose, síndromes de deficiências metabólicas e digestivas associadas à obesidade, síndrome do desconforto respiratório agudo (ARDS), pancreatite, diabetes do tipo 2, resistência à insulina e câncer. Razões pelas quais as PLA₂ têm sido alvos da indústria farmacêutica não somente em busca de inibidores destas enzimas, mas também como potenciais fármacos (BALSINDE et al., 2002; SUN et al., 2010; MURAKAMI et al., 2011).

Atualmente, as PLA₂ são divididas em cinco grandes classes de acordo com seus mecanismos catalíticos (His / Asp, Ser / Asp ou Ser / His / hidrolase Asp), características funcionais e estruturais: PLA₂ secretadas (sPLA₂), PLA₂ citosólicas (cPLA₂), PLA₂ independentes de Ca²⁺ (iPLA₂), as acetil-hidrolases do fator ativador de plaquetas (PAF-AH) e as PLA₂ lisossomais (SCHALOSKE e DENNIS, 2006). Além disso, as PLA₂ estão subdivididas em 15 grupos com suas variações (BURKE e DENNIS, 2009).

As sPLA₂ possuem baixo peso molecular (14-18kDa), de seis a oito pontes dissulfeto e exigem quantidades milimolares de Ca²⁺ para sua atividade catalítica e utilizam uma histidina em seu sítio ativo (DENNIS, 1994; SCHALOSKE e DENNIS, 2006; BURKE e DENNIS, 2009). Dentre as sPLA₂ estão os grupos I,II,III, V, IX, X, XI, XII, XIII E XIV (BURKE e DENNIS, 2009).

As cPLA₂ ou intracelulares, são grandes proteínas citosólicas de alto peso molecular (61-114 kDa), utilizam uma serina em seu sítio catalítico, não necessitam de Ca²⁺ para sua atividade catalítica, mas sim para a translocação da enzima para membranas intracelulares. Deste grupo fazem parte as PLA₂ dos subgrupos IVA, IVB, IVC, IVD E IVF (SCHALOSKE e DENNIS, 2006; BURKE e DENNIS, 2009).

As iPLA₂ não dependem de Ca²⁺ para a atividade enzimática e utilizam uma serina em seu sítio ativo. Nesta classe está incluso o grupo VI e suas formas variantes VIA-1, VIA-2, VIB, VIC, VID, VIE E VIF (SCHALOSKE e DENNIS, 2006). As PAF-HA compreendem dois grupos de PLA₂ (VII e VIII) que podem hidrolisar o grupo acetil na posição *Sn*-2 do fator de ativação de plaquetas (PAF), funcionam pela ação de uma serina catalítica e não requerem Ca²⁺ para a sua atividade (BURKE e DENNIS, 2009). A PLA₂ lisossomal (grupo XV), foi purificada a partir de cérebro bovino e acilatos de ceramida, utiliza o grupo acil na posição *Sn*-2 de fosfolípidios como substrato, contém uma tríade Ser-His-Asp conservada e tem quatro resíduos de cisteína que são necessários para atividade catalítica (BURKE e DENNIS, 2009).

TABELA 1– Divisão das PLA₂

Classe	Subgrupo	Massa molecular (KDa)	Fonte
sPLA ₂	IA	13-15	Venenos de Serpentes <i>Elapidae</i>
sPLA ₂	IB	13-15	Humanos/ Pâncreas suíno
sPLA ₂	IIA	13-15	Venenos de serpentes, fluído sinovial humano
sPLA ₂	IIB	13-15	Serpentes <i>Viperidae</i>
sPLA ₂	IIC	15	Ratos/ testículos de murinos
sPLA ₂	IID	14-15	Humanos/ pâncreas de murinos/baço
sPLA ₂	IIE	14-15	Humanos/ cérebro de murinos/ coração/ útero
sPLA ₂	IIF	16-17	Humanos/ testículos de murinos/ embriões
sPLA ₂	III	15-18	Humanos/ murinos/ lagartos/ abelhas
cPLA ₂	IVD	92-93	Humanos/ murinos
cPLA ₂	IVA	85	Humanos/ murinos
cPLA ₂	IVB	114	Humanos
cPLA ₂	IVC	61	Humanos
cPLA ₂	IVE	100	Murinos
cPLA ₂	IVF	96	Murinos
sPLA ₂	V	14	Humanos/ coração de murinos/ pulmão/ macrófagos
iPLA ₂	VIA-1	84-85	Humanos/murinos
iPLA ₂	VIA-2	88-90	Humanos/ murinos
iPLA ₂	VIB	88-91	Humanos/ murinos
iPLA ₂	VIC	146	Humanos/ murinos
iPLA ₂	VID	53	Humanos
iPLA ₂	VIE	57	Humanos
iPLA ₂	VIF	28	Humanos

AH-PAF	VIIA	45	Humanos/ murinos/ suínos/ bovinos
AH-PAF	VIIB	40	Humanos/ bovinos
AH-PAF	VIIIA	26	Humanos
AH-PAF	VIIIB	26	Humanos
sPLA ₂	IX	14	Veneno de caracol
sPLA ₂	X	14	Baço humano/ leucócitos/ timo
sPLA ₂	XIA	124	Plantas
sPLA ₂	XIB	129	Plantas
sPLA ₂	XII	19	Humanos/ murinos
sPLA ₂	XIII	<10	Parvovírus
sPLA ₂	XIV	13-19	Fungos simbióticos/ bactérias
PLA ₂	XV	45	Humanos/ murinos/ bovinos

lisossomal

Adaptado de BURKE e DENNIS, 2009.

As sPLA₂ de venenos de serpentes (sPLA₂vs) pertencem aos grupos I e II. As do subgrupo I são encontradas em venenos de serpentes da família Elapidae, e as do subgrupo II são encontradas em serpentes da família Viperidae (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2012). As sPLA₂vs induzem uma grande variedade de efeitos farmacológicos e tóxicos, como miotoxidade, neurotoxicidade pré e pós-sináptica, nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, hemolítico, hipotensor, anticoagulante, edematogênico, pró-inflamatórios e efeitos sobre a agregação plaquetária (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997; HARRIS et al., 2000; SINGH et al., 2000; SOARES et al., 2004; RODRIGUES et al., 2004; ZULIANI et al., 2005a; BORJA-OLIVEIRA et al., 2007; SANTOS-FILHO et al., 2008; EVANGELISTA et al., 2010). Além da grande quantidade de atividades biológicas, as sPLA₂vs tem sido exploradas devido a sua homologia com as sPLA₂ de mamíferos (CHIATO e WARD, 2003).

As sPLA₂vs podem ser ácidas ou básicas, sendo que estas últimas são classificadas de acordo com a atividade enzimática, devido ao aminoácido presente na posição 49 da estrutura primária, em Asp-49 e Lys-49 (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997; OWNBY et al., 1999; SIX e DENNIS, 2000). As sPLA₂vs Asp-49 são enzimaticamente ativas e dependentes de Ca²⁺, cujo seu sítio catalítico é formado por resíduos conservados de His-48 e Asp-99 que interagem com uma

molécula de água. Também possuem uma alça de ligação ao Ca^{2+} formada pelos resíduos Tyr-28, Gly-30, Gly-32 e Asp-49, sendo este último fundamental para a ligação ao Ca^{2+} , uma vez que os oxigênios do grupo carboxila presente no resíduo de Asp contribuem para a catálise (MARAGONORE et al., 1984; ARNI e WARD, 1996; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997; BALSINDE et al., 1999) (Figuras 3 e 4).

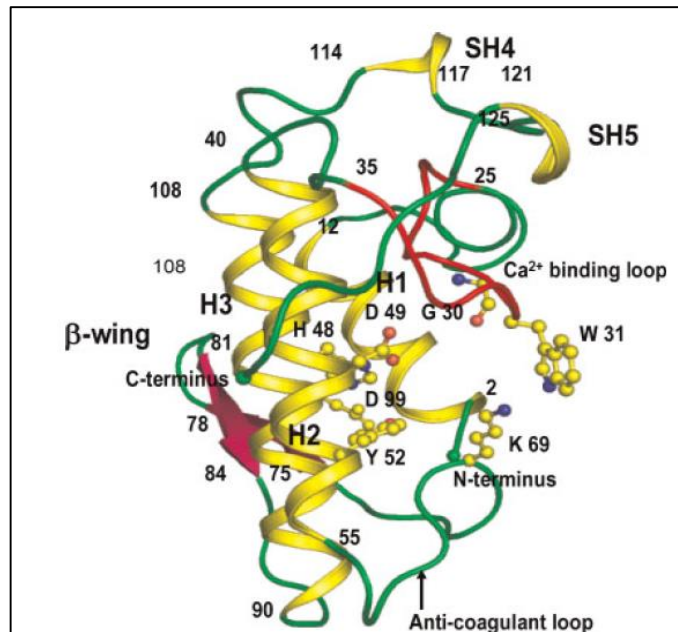


Figura 3. Representação tridimensional sPLA2vs Asp-49 purificada de *Daboia russelli pulchella*. Observa-se a região C-terminal, a região N-terminal, as três principais α -hélices (H1, H2 e H3) e um par de folhas β antiparalela (ala β), domínio de ligação ao substrato, sítio catalítico e o domínio de ligação ao Ca^{2+} (SINGH et al., 2009).

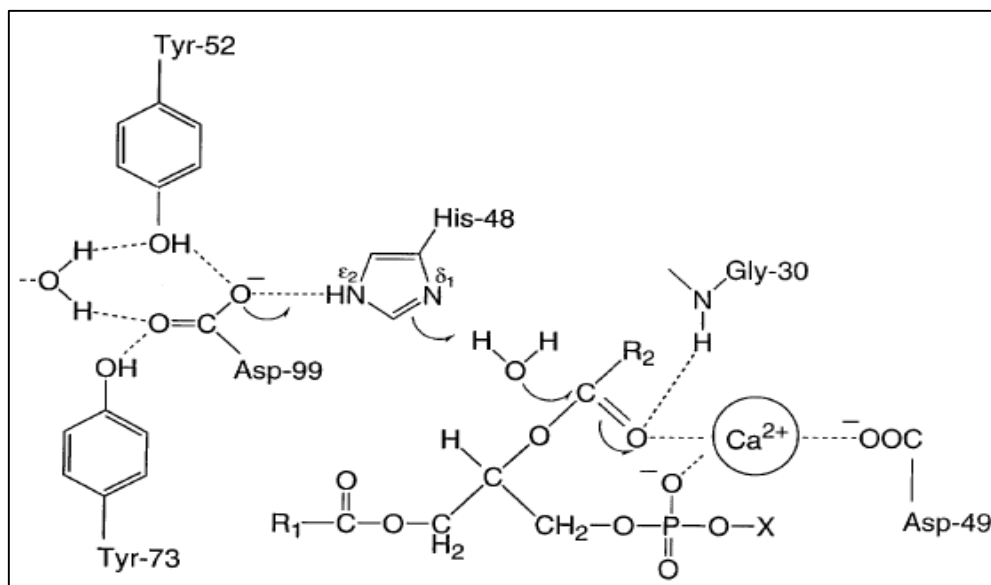


Figura 4. Mecanismo de ação das sPLA₂sv Asp-49 (JANSSEN et al., 1999).

Nas sPLA₂vs Asp-49 a ação enzimática está relacionada com a formação de mediadores lipídicos da resposta inflamatória (KINI, 2003). Estudo realizado por Zuliani e colaboradores (2005a) demonstrou que uma sPLA₂vs Asp-49 (MT III) de *Bothrops asper* é capaz de induzir diversos eventos inflamatórios, tais como: extravasamento vascular, infiltração leucocitária e liberação de eicosanóides e citocinas (IL-1, IL-6 e TNF- α).

As sPLA₂vs Lys-49 não possuem atividade enzimática, pois a substituição do Asp na posição 49 pela Lys impede a ligação com o cofator Ca²⁺ e a formação do intermediário tetraédrico no mecanismo catalítico (CHIATO e WARD, 2003). Porém, elas podem exibir efeitos semelhantes aos causados pelas Asp-49, como miotoxicidade, citotoxicidade, indução de edema e inflamação por mecanismos independentes da atividade enzimática (SOARES et al., 2000; ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; ZULIANI et al., 2005a). Estudos com peptídeos sintéticos e mutagênese demonstram que a atividade miotóxica dessas toxinas está relacionada com sua região C-terminal, cuja sequência de aminoácidos hidrofóbicos seria responsável pela interação com a membrana plasmática, o que causaria danos à integridade da membrana, liberação de Ca²⁺ intracelular e morte celular (WARD et al., 2002; AMBROSIO et al., 2005; CHIOATO et al., 2007; FERREIRA e WARD, 2009; GIANNOTTI et al., 2013).

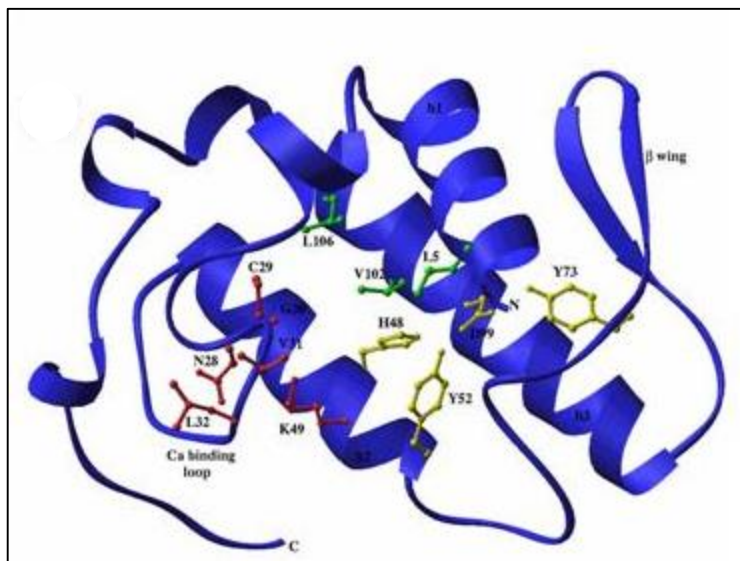


Figura 5. Representação tridimensional sPLA₂vs Lys-49 (BthTX I) de *Bothrops jararacussu*. Observa-se a região C-terminal, resíduos de Cys nas pontes de dissulfeto. O modelo tem três principais α -hélices (H1, H2 e H3) e um par de folhas β antiparalela (ala β), domínio de ligação ao substrato (verde), sítio catalítico (amarelo) e o domínio de ligação ao Ca^{2+} (vermelho) (SOARES et al., 2007).

Estudos realizados por Delatorre e colaboradores (2011), a partir da interação de uma sPLA₂vs Lys-49 com ácido mirístico, observaram que a presença de resíduos de aminoácidos positivos na região C-terminal permite uma interação eletrostática com a carga negativa da membrana causada pelos grupamentos fosfatos. No mesmo estudo também foi observado uma interação dos resíduos de aminoácidos aromáticos hidrofóbicos da proteína com a região hidrofóbica da membrana, o que permite a sua penetração. Resultados semelhantes foram obtidos em estudos baseados na interação da heparina com a região C-terminal (resíduos 115-129) da proteína enzimaticamente inativa, demonstrando ser essa região responsável pela atividade miotóxica (LOMONTE et al., 1994).

Independentemente da atividade enzimática, estudos apontam a existência de receptores na membrana celular de mamíferos homólogos aos receptores de manose de macrófagos que possivelmente estão associados aos efeitos neurotóxicos e miotóxicos dessas toxinas. São os receptores do tipo M (células do músculo esquelético) e do tipo N (células neuronais) (LAMBEAU et al., 1990; LAMBEAU et al., 1994; LAMBEAU e LAZDUNSKI, 1999; KINI, 2005; SRIBAR e KRIZAJ, 2011). Esse fato explicaria a grande diversidade de ações farmacológicas e tóxicas dessas enzimas. Sendo que cada sPLA₂ possui alvo molecular em um tipo celular específico, causando danos em locais diferentes do organismo. Segundo essa teoria as sPLA₂vs inicialmente se ligam aos receptores na membrana

plasmática e a partir daí desenvolvem sua ação catalítica ou não sobre os lisofosfolípídeos da membrana celular (KINI e EVANS, 1989; CHIOATO e WARD, 2003; KINI, 2003). Outro trabalho indica o envolvimento de receptores purinérgicos no mecanismo de ação das Lys-49 (TONELLO et al., 2012).

Além dos estudos de toxicidade, outros trabalhos apontam uma gama de atividades biológicas para as sPLA₂s, como bactericida (SOARES et al., 2000; RODRIGUES et al., 2004; BARBOSA et al., 2005), antiplasmodial (CASTILLO et al., 2012) e antitumoral (ARAYA e LOMONTE, 2007; ZOUARI-KESSENTINI et al., 2013). Diante de todos estes fatores, pesquisadores buscam elucidar o mecanismo de ação dessas proteínas e também seus efeitos locais e sistêmicos sobre organismos de mamíferos e patógenos, visando a bloquear a atividade dessas proteínas ou mesmo utilizá-las como fonte para o desenho de novos fármacos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar e comparar a atividade tóxica da PLA₂ isolada do veneno de *Bothrops diporus* em modelo experimental murino.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar PLA₂ básicas do veneno de *B. diporus*;
- Avaliar *in vivo* o efeito de uma PLA₂ isolada e do veneno de *B. diporus* em modelo animal (murino) sobre:
 - Indução do edema de pata;
 - Atividade miotóxica;
 - Efeitos sistêmicos sobre as funções hepática e renal dos camundongos.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO DAS PLA₂s DE *B. diporus*

Todas as etapas de isolamento proteico foram realizadas no Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde, CEBio-UNIR-FIOCRUZ-RO sob supervisão do Dr. Andreimar Martins Soares.

3.1.1 Venenos

O veneno de *B. diporus* (VBd) utilizado durante o estudo foi adquirido do Serpentário Proteínas Bioativas Ltda, Batatais-SP e mantido refrigerado (2 a 8°C) no Banco de Venenos Amazônicos do CEBio-UNIR-FIOCRUZ-RO, (autorização: CGEN/CNPq 010627/2011-1 e IBAMA 27131-2).

3.1.2 Etapas cromatográficas

O isolamento e a purificação das PLA₂s foram feitos como descrito por Soares e colaboradores (1998). Foram aplicadas técnicas de cromatografia de alta eficiência (CLAE) em sistema *Akta Purifier* (GE). Inicialmente, cerca de 50mg do veneno bruto de *B. diporus* foram suspensos em 1,0 mL de tampão bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃) 20 mM, pH 8,0 e centrifugados a 83,16 x g durante 10 minutos. O sobrenadante foi submetido ao fracionamento utilizando a técnica de cromatografia de troca iônica, em coluna contendo resina CM-*Sepharose* FF® (1 x 40 cm) previamente equilibrada com tampão de NH₄HCO₃ 20 mM, pH 8,0, e eluída no mesmo tampão em gradiente crescente (0-100 %) de NH₄HCO₃ 500 mM, em 5 volumes de coluna, sob fluxo de 1 mL / minuto. A eluição foi monitorada em 280 nm e as frações coletadas manualmente. As frações obtidas foram analisadas quanto ao peso molecular por SDS-PAGE em gel de poli(acrilamida) 12,5 % e quanto à atividade enzimática por hemólise indireta, sendo selecionadas as frações que possuíam atividade de PLA₂ ou peso molecular correspondente. As frações com características de PLA₂ foram submetidas à cromatografia de fase reversa, utilizando-se coluna *Discovery*® C18 (25 x 4.6 mm - Supelco) previamente equilibrada com solução TFA 0,1 % (Solução A) e eluída sob gradiente de 0 a 70 % de solução B (acetonitrila +

TFA 0,1 %), 5 volumes de coluna, sob fluxo de 1 mL / min. A eluição foi monitorada em 280nm e as frações relevantes coletados manualmente. A pureza das amostras obtidas foi verificada por SDS-PAGE, em gel de poliacrilamida 15 %.

3.1.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 ou 15 % (m/v) na presença de SDS (SDS-PAGE) foi realizada conforme descrito por Laemmli (1970) com modificações, em condições redutoras. O gel de separação poliacrilamida 12,5 ou 15 % (m/v) foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M e SDS 1%. O gel de empacotamento de poliacrilamida foi preparado em tampão de Tris-HCl 0,5M e SDS 0,1 %. As amostras de veneno ou proteína foram dissolvidas em água deionizada e 10 µL dessa solução foram adicionados a 10 µL de tampão para amostra (Tris-HCl 0,5 M, pH 6,5, contendo azul de bromofenol 0,01 % e SDS 2 %) e submetidas ao aquecimento a 100 °C durante 5 minutos. A corrida eletroforética foi realizada em tampão Tris-Glicina 95 V e 15 mA (*Electrophoresis Power Supply EPS 301-AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH*). O gel foi fixado em solução aquosa de metanol 40 % (v/v) e ácido acético 7 % (v/v) por 30 minutos. As bandas de proteínas foram evidenciadas através da imersão em solução contendo *Coomassie Brilliant Blue G-250*® 0,08 % (m/v), sulfato de alumínio 8,0 % (m/v), ácido o-fosfórico 1,6 % (m/v) e metanol 20,0 % (v/v) pelo período de 2 horas. O excesso de corantes foi retirado por imersão em solução descorante contendo etanol 4,0 % e ácido acético 7,0 % (v/v) em água. A imagem dos géis foi obtida com uso do equipamento *Image scanner*® (GE Healthcare Lifesc.) e a massa molecular relativa (*Mr*) determinada com uso do programa *IQTL*® (GE Healthcare Lifesc) comparando-se as distâncias relativas de migração das amostras com os padrões de massa molecular.

3.1.4 Dosagem proteica

A dosagem de proteínas foi realizada com Kit para dosagem de proteínas *Bio-Rad DC Protein Assay* (BIO-RAD). O ensaio é baseado na reação da proteína com uma solução de tartarato de cobre alcalino e reagente de Folin. O método foi adaptado para microplacas, sendo utilizados 25 µL da solução A (solução de tartarato de cobre alcalino), 200 µL da solução B (solução diluída do reagente Folin)

e 5 μL de amostra, incubados a 37 °C durante 15 minutos. A leitura foi feita em espectrofotômetro em 750 nm.

3.1.5 Atividade fosfolipásica indireta

Para verificação da atividade fosfolipásica indireta foi utilizado método da hemólise radial indireta em placas, conforme descrito por Gutiérrez e colaboradores (1988). Para preparo da solução de eritrócitos, foram centrifugados 3 mL de sangue coletado com 0,2 % de citrato de sódio. Em seguida, as hemácias foram lavadas 3 vezes (1 volume de hemácias para 2 volumes de solução de lavagem – NaCl 150 mM). Após lavagem, os eritrócitos foram ressuspensos em tampão fosfato salina (PBS) de modo a formar uma suspensão com 3 % de hemácias. Preparou-se então a solução 1, formada por 3 mL da suspensão de hemácias, 150 μL de CaCl_2 10 mM e 100 μL de suspensão de gema de ovo 10 % (m/v). Em seguida preparou-se a solução 2, composta de 180 mg de agarose e 15 mL de PBS, aquecidos ao microondas até a dissolução completa da agarose. Após breve resfriamento as soluções 1 e 2 são misturadas e a mistura é rapidamente despejada em uma placa. Após polimerização do gel, foram feitos pequenos orifícios no mesmo (2 mm) onde foram acrescentados 3 μL de amostra. A placa foi incubada a 37 °C por aproximadamente 12 horas, depois foi verificado a formação de um halo de hemólise ao redor do orifício, indicando a atividade indireta da PLA_2 .

3.1.6 Atividade fosfolipásica direta

Para a determinação da atividade fosfolipásica direta foi utilizado o método descrito por Holzer e Mackessy (1996) adaptado para placa de 96 poços. Utilizou-se 190 μL de solução tampão Tris 10 mM, CaCl_2 10 mM, NaCl 100 mM, e pH 8.0 contendo o substrato cromógeno ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi)-benzóico (4N3OAB) e 10 μL de amostras (VBd 8,5 μg , BdipTX-I 1 e 9,2 μg e BdipTX-II 1 μg) ou de água (controle negativo). A solução foi incubada a 37 °C e a leitura foi feita em espectrofotômetro Econ (Biotek) a 440 nm em intervalos de 30 segundos durante 30 minutos.

3.2 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE BdipTX-I

O sequenciamento da estrutura *N*-terminal da proteína isolada foi realizado em microsequenciador automático PPSQ-33A (Shimadzu), o qual utiliza o processo químico de sequenciamento por clivagem *N*-terminal, derivado do método desenvolvido por Pehr Edman conforme descrito por Gray (1972).

3.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA – EFEITO LOCAL E SISTÊMICO

3.3.1 Animais utilizados nos experimentos

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, com peso entre 18 a 22 g, fornecidos pelo Biotério do Instituto de Pesquisa em Patologias Tropicais – IPEPATRO/FIOCRUZ. Os animais foram mantidos em condições padronizadas de biotério com temperatura e luz controladas, água e alimentação *ad libitum* até o momento dos experimentos. Aprovação na Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA) 2012/08.

3.3.2 Obtenção das amostras de plasma e urina

Os experimentos foram feitos conforme descrito anteriormente por Souza e colaboradores (2012). Os camundongos (grupos de cinco animais) foram inoculados com 50 µg de veneno de *B. diporus* (VBd) ou BdipTX-I (PLA₂) diluídos em 20 µL de salina estéril 150 mM no músculo gastrocnêmico direito, utilizando-se como controle solução salina 150 mM. Os animais inoculados foram mantidos individualmente em gaiolas metabólicas durante três horas para a coleta de urina. O sangue foi coletado pelo plexo orbital com o auxílio de pipetas heparinizadas e centrifugado a 2205 x g durante 5 minutos para obtenção do plasma. As amostras foram mantidas refrigeradas (2 a 6 °C) até o momento das dosagens. A avaliação do efeito sistêmico foi realizada por meio da utilização de Kits de diagnóstico, seguindo as instruções de uso do fabricante, com adaptações quanto aos volumes observando as devidas proporções. A leitura foi feita em espectrofotômetro Econ (Biotek).

3.3.3 Edema

Grupos de quatro animais foram injetados no coxim plantar da pata posterior direita com 20 μ L de solução preparada com NaCl 150 mM e BdipTX-I ou VBd, nas concentrações de 5 e 20 μ g / pata. A pata contralateral controle foi injetada com 20 μ L de NaCl 150 mM estéril. O aumento do volume da pata foi determinado com o auxílio de um pletismômetro Ugo Basile, nos tempos de 0, 0,5, 1, 2, 3, 6 e 24 horas após a injeção do VBd ou da BdipTX-I. Os resultados foram expressos como o aumento percentual do volume das patas experimental em relação às patas controle.

3.3.4 Atividade miotóxica

Foram injetados 50 μ g da BdipTX-I ou VBd diluídos em 20 μ L de PBS no músculo gastrocnêmico direito de camundongos Swiss (18-22 g) (grupos de 5 animais). Depois de 3 horas, o sangue foi coletado do plexo orbital com pipetas heparinizadas e centrifugado a 22,05 x g durante 5 minutos para obtenção do plasma. A atividade miotóxica foi avaliada com kits de diagnóstico laboratoriais, sendo dosadas as atividades das enzimas creatina quinase (CK), sua fração cardíaca CK-MB e a desidrogenase láctea (LDH).

Para dosagem de CK-total foi utilizado sistema para determinação quantitativa da Creatina Quinase Total CK-NAC Liquiform (Labtest, Ref.: 117). Para isso, 5 μ L de plasma foi incubado durante 3 min a 37 °C com 250 μ L do reagente de trabalho (RT). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 340 nm e a atividade expressa em unidades/litro (U/L) foi determinada pela comparação com uma amostra padrão fornecida pelo fabricante do kit.

A atividade da fração CK-MB foi realizada com sistema para determinação da isoenzima MB da Creatina Quinase em modo cinético CK-MB Liquiform (Labtest, Ref.: 118). Foram adicionados 200 μ L de RT a 10 μ L de amostra (plasma). A mistura foi homogeneizada e incubada durante 5 minutos a 37 °C, onde foi realizado o registro da absorbância inicial (A_1), a 340 nm. Em seguida, a amostra foi incubada por mais 5 minutos e registrada a absorbância final (A_2). A atividade CK-MB (U/L) foi determinada pela comparação com uma amostra padrão fornecida pelo fabricante do kit.

As taxas de Desidrogenase Láctica (LDH) foram avaliadas com sistema para determinação da Desidrogenase Láctea por método cinético LDH Liquiform (Labtest, Ref.: 86). Foram adicionados 250 µL de RT a 5 µL de amostra (plasma). A mistura foi homogeneizada e incubada durante 1 minuto a 37 °C e registrada a absorbância inicial (A_1) e após mais 2 minutos, a absorbância final (A_2). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 340 nm. A atividade LDH (U/L) foi determinada pela comparação com uma amostra padrão fornecida pelo fabricante do kit.

3.3.5 Efeitos sobre a função hepática

Para avaliação do efeito hepatotóxico causado pelo VBd e pela BdipTX-I foram dosadas as enzimas Aspartato Amino transferase (AST), Alanina Aminotransferase (ALT), Gama Glutamil Transferase (GGT) em conjunto com a liberação da Fosfatase Alcalina (FAL).

A atividade da AST foi dosada com sistema para determinação da Aspartato Amino transferase ou Transaminase Glutâmico Oxalacética em modo cinético AST/GOT Liquiform (Labtest, Ref.: 109). Foram adicionados 200 µL de RT a 20 µL de amostra (plasma). A mistura foi homogeneizada e incubada durante 1 minuto a 37 °C e registrada a absorbância inicial (A_1) e após mais 2 minutos a absorbância final (A_2). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 340 nm. A atividade da TGO (U/L) foi determinada pela comparação com uma amostra padrão fornecida pelo fabricante do kit.

A dosagem de ALT foi feita com sistema para determinação da Alanina Aminotransferase ou Transaminase Glutâmico Pirúvica em modo cinético ALT/GPT Liquiform (Labtest, Ref.: 108). O procedimento consistiu em adicionar 200 µL de RT a 20 µL de amostra (plasma). A mistura foi homogeneizada e incubada durante 1 minuto a 37 °C e registrada a absorbância inicial (A_1) e, após mais 2 minutos, a absorbância final (A_2). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 340 nm. A atividade da TGO (U/L) foi determinada pela comparação com uma amostra padrão fornecida pelo fabricante do kit.

A atividade da GGT foi avaliada com sistema para determinação quantitativa da atividade da γ -Glutamil Transferase em modo cinético GAMA GT Liquiform (Labtest, Ref.: 105). Para dosagem, foram adicionados 200 µL de RT a 10 µL de amostra (plasma). A mistura foi homogeneizada e incubada durante 1 minuto

a 37 °C e registrada a absorbância inicial (A_1) e, após mais 2 minutos, a absorbância final (A_2). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 405 nm. A atividade da GGT (U/L) foi determinada pela comparação com uma amostra padrão fornecida pelo fabricante do kit.

A atividade da fosfatase alcalina (FAL) foi feita utilizando-se sistema para determinação da fosfatase alcalina por método cinético de tempo fixo e medição de ponto final FOSFATASE ALCALINA (Labtest, Ref.: 40). Para a dosagem, misturou-se 10 µL de amostra (plasma) a uma solução previamente incubada a 37 °C durante 2 minutos de substrato (nº1) e tampão (nº2) e incubou-se por 10 minutos a 37 °C. Acrescentou-se 400 µL do reagente de cor (nº 3). Em seguida foi feita a leitura em espectrofotômetro a 590 nm. A atividade da Fosfatase Alcalina (U/L) foi determinada pela comparação com uma amostra padrão fornecida pelo fabricante do kit.

3.3.6 Efeitos sobre a função renal

Para avaliação do efeito nefrotóxico causado pelo VBd e pela BdpTX-I, dosou-se os marcadores bioquímicos da função renal creatinina e ureia no plasma e na urina além de proteínas totais e cálcio na urina.

A dosagem de creatinina foi feita com kit CREATININA CINÉTICA K067 (Bioclin). Foram adicionados 200 µL de RT a 20 µL de amostra (plasma ou urina). A mistura foi homogeneizada e incubada durante 30 segundos a 37°C e registrada a absorbância inicial (A_1) e aos 90 segundos a absorbância final (A_2). A leitura foi feita em espectrofotômetro a 510 nm. A quantidade de creatinina (mg/dL) liberada foi determinada pela comparação com uma amostra padrão fornecida pelo fabricante do kit.

A dosagem de ureia no soro e no plasma foi realizada utilizando-se sistema enzimático-colorimétrico para determinação de ureia por reação de ponto final UREIA CE (Labtest). O procedimento experimental consistiu em adicionar em microtubos 5 µL de amostra (plasma ou urina diluída 1:50) mais 500 µL de RT (uréase tamponada). A mistura foi homogeneizada e incubada a 37 °C durante 5 minutos. Em seguida, 500 µL de oxidante de uso foram adicionados à mistura inicial e mais 5 minutos de incubação foram aguardados. Após incubação, 200 µL das soluções foram postos em placa de 96 poços e a leitura da absorbância feita em espectrofotômetro a 600 nm. A quantidade de ureia excretada (mg/dL) foi

determinada pela comparação com uma amostra padrão fornecida pelo fabricante do kit.

A excreção de proteínas na urina foi avaliada com sistema para determinação de proteínas na urina e líquido por reação de ponto final SENSIPROT Labtest. Para dosagem foram adicionados 10 µL de amostra a 200 µL de reagente do reagente de cor. A mistura foi incubada durante 5 minutos a 37 °C e então a leitura foi feita em espectrofotômetro a 600 nm. A quantidade de proteínas liberada (mg/dL) foi determinada pela comparação com uma amostra padrão fornecida pelo fabricante do kit.

A excreção de cálcio na urina foi avaliada com sistema para determinação de cálcio por reação de ponto final CÁLCIO Liquiform Labtest (Ref.: 90). Foram adicionados 10 µL de amostra a 500 µL de RT e procedeu-se a leitura em espectrofotômetro a 570 nm. A quantidade de cálcio liberada (mg/dL) foi determinada pela comparação com uma amostra padrão fornecida pelo fabricante do kit.

3.4 Análise estatística

Os dados experimentais foram analisados estatisticamente por Análise de Variância (ANOVA - *one-way analyses of variance*), seguida de teste de pós-teste Tukey. Os resultados obtidos foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM). Sendo, que a diferença entre as médias foi considerada significativa quando $p < 0,05$.

4 RESULTADOS

4.1 ISOLAMENTO DAS PLA₂S DE *B. diporus*

4.1.2 Etapas Cromatográficas e eletroforéticas

O fracionamento do veneno de *B. diporus* por cromatografia de troca iônica em coluna de CM-Sepharose resultou na coleta de sete frações, que foram denominados P I a P VII, como pode ser observado na Figura 6. As frações, assim como o veneno bruto foram submetidos a análise por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12,5 % (Figura 7). Dois critérios foram levados em consideração para escolha das frações a serem purificadas: o tempo de retenção com relação à concentração da solução B e o peso molecular correspondente ao de PLA₂ (aproximadamente 14 KDa). As frações P VI e P VII apresentaram essas características e por isso foram selecionadas para o processo de purificação em cromatografia de fase reversa em coluna C-18.

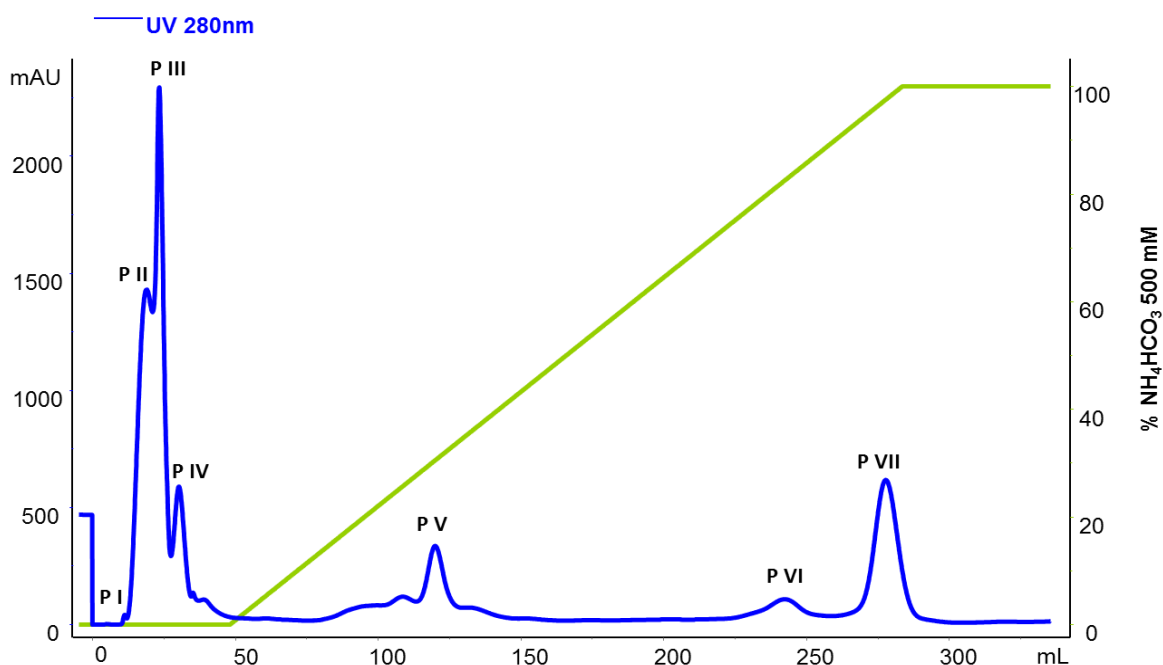


Figura 6. Fracionamento do VBd por cromatografia de troca iônica. 50 µg de VBd diluídos em 1 mL de NH₄HCO₃ 20 mM pH 8,0 foram eluídos em gradiente crescente NH₄HCO₃ (20 a 500 mM), em coluna contendo CM-Sepharose previamente equilibrada com solução de NH₄HCO₃ 20 mM, fluxo 1 mL / minuto. As frações cuja absorbância a 280 nm foi relevante foram coletadas e denominadas P I a P VII.

O perfil eletroforético do VBd e de suas frações revelou ainda a possível presença de PLA₂s ácidas nas frações P II e P III e proteases em P II, P III, P IV e P VI (Figura 7).

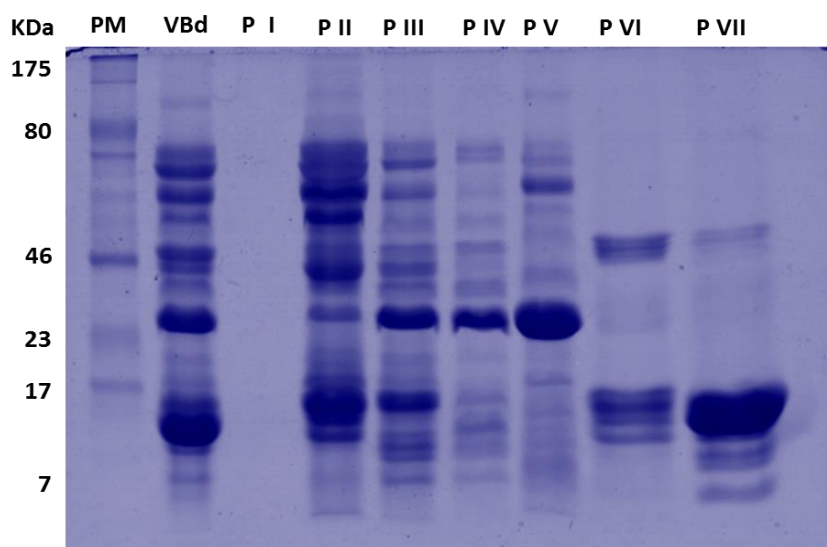


Figura 7. Perfil eletroforético do VBd e das frações obtidas por cromatografia de troca iônica. O VBd e as frações (P I a P VII) foram submetidos a análise por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12,5 % em condições redutoras e coradas com solução contendo *Coomassie Brilliant Blue* 0,08 % (m/v), sulfato de alumínio 8,0 % (m/v), ácido o-fosfórico 1,6 % (m/v) e metanol 20,0 % (v/v) pelo período de 2 horas. As bandas obtidas foram comparadas ao padrão de PM.

A fração P VII foi submetida a uma única etapa de cromatografia de fase reversa, na qual foi purificada a primeira PLA₂ básica do VBd, que foi intitulada BdipTX-I (Figura 8). Pode-se observar pelo cromatograma abaixo que BdipTX-I é eluída com, aproximadamente 35,4 % de solução de acetonitrila + TFA 0,1 %.

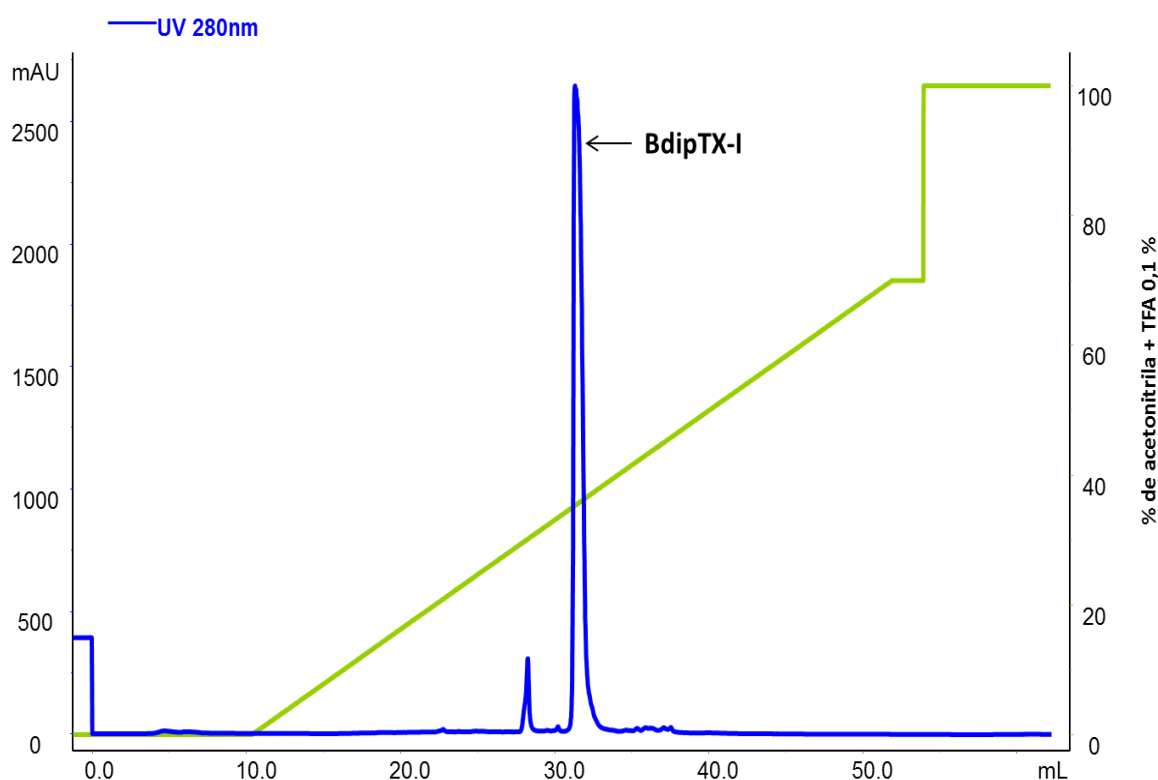


Figura 8. Purificação de BdipTX-I por cromatografia de fase reversa. A fração P VII foi diluída em solução de TFA 0,1 % e eluída em gradiente de 0 a 70 % de acetonitrila + TFA 0,1 %, em coluna Discovery® C-18, fluxo de 1 mL / minuto. A seta indica a PLA₂ básica isolada do veneno de *B. diporus*, BdipTX-I, a qual é eluída com 35,4 % da solução de acetonitrila + TFA 0,1 %.

A fração P VI também foi submetida à cromatografia de fase reversa e deu origem a mais seis frações, intituladas D I a D VI (Figura 9). As frações foram testadas quanto à atividade fosfolipásica e D III, que é eluída com 37 % da solução de acetonitrila + TFA 0,1 %, revelou ser enzimaticamente ativa. Porém, D III continha impurezas e necessitou passar por uma nova etapa cromatográfica em coluna de fase reversa, que resultou no isolamento da segunda fosfolipase básica do veneno de *B. diporus*, denominada BdipTX-II.

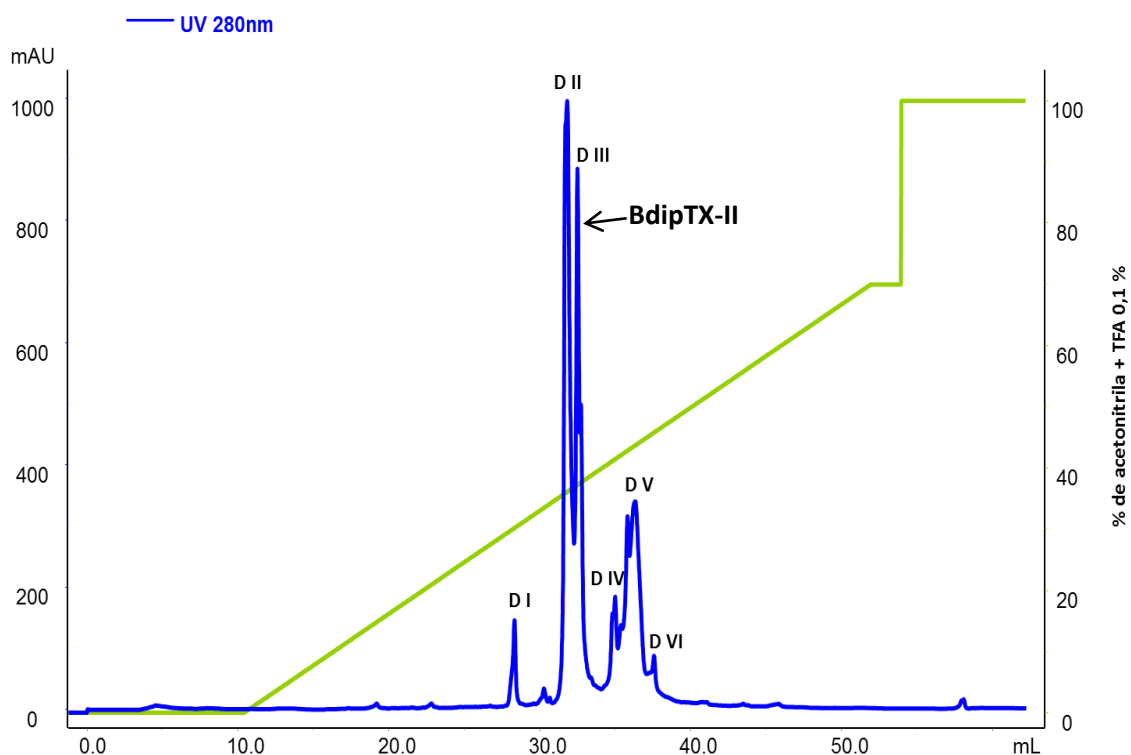


Figura 9. Isolamento de BdipTX-II por cromatografia de fase reversa. A fração denominada P VI foi diluída em solução de TFA 0,1 % e eluída em gradiente de 0 a 70 % de acetonitrila + TFA 0,1 %, em coluna Discovery® C-18, fluxo de 1 mL / minuto. Foram obtidos 6 frações denominadas D I a D VI. Após teste enzimático a fração D III foi identificada como tendo atividade PLA₂ e foi novamente submetida à cromatografia de fase reversa, na qual foi isolada BdipTX-II.

Após as etapas cromatográficas, BdipTX-I e BdipTX-II foram analisadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15 % para averiguar a massa molecular aproximada, comparando-se ao padrão de peso molecular (PM), e a pureza das duas proteínas isoladas (Figura 10). A análise do gel demonstrou que as duas PLA₂s apresentaram grau de pureza satisfatório, sem a presença de bandas interferentes e que a massa molecular aproximada das proteínas está torno de 14 kDa.

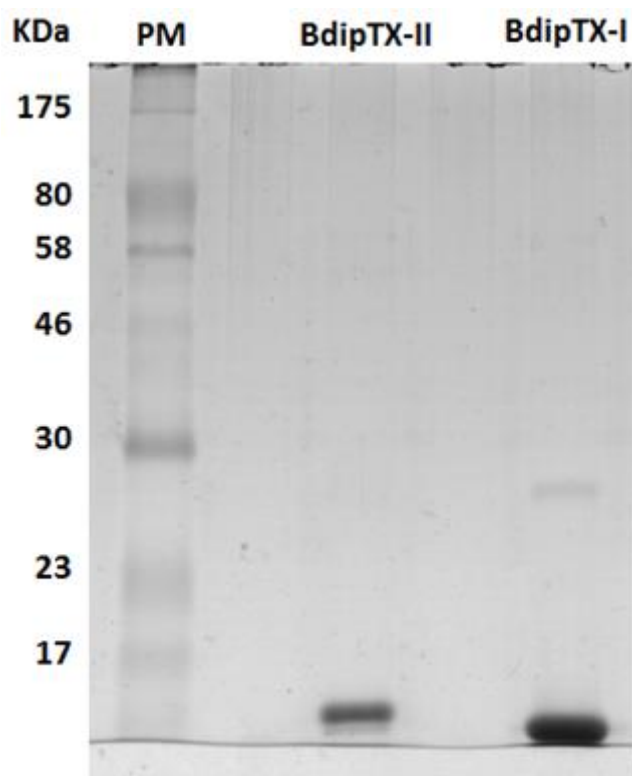


Figura 10. Eletroforese das PLA₂s isoladas do VBd. BdipTX-I e a BdipTX-II de *B. diporus* foram submetidas a análise por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 15 % em condições redutoras, corado em solução contendo *Coomassie Brilliant Blue* 0,08 % (m/v), sulfato de alumínio 8,0 % (m/v), ácido o-fosfórico 1,6 % (m/v) e metanol 20,0 % (v/v) pelo período de 2 horas. As bandas obtidas foram comparadas ao padrão de PM e observadas quanto à presença de impurezas.

4.1.3 Atividade fosfolipásica indireta

O teste de hemólise indireta demonstrou que o VBd, as frações PII e P III e BdipTX-II possuem atividade fosfolipásica, uma vez que houve formação de halos hemolíticos translúcidos. Em contraste, a BdipTX-I não parece ser enzimaticamente ativa, já que não houve formação de halo nos orifícios testados (Figura 11).

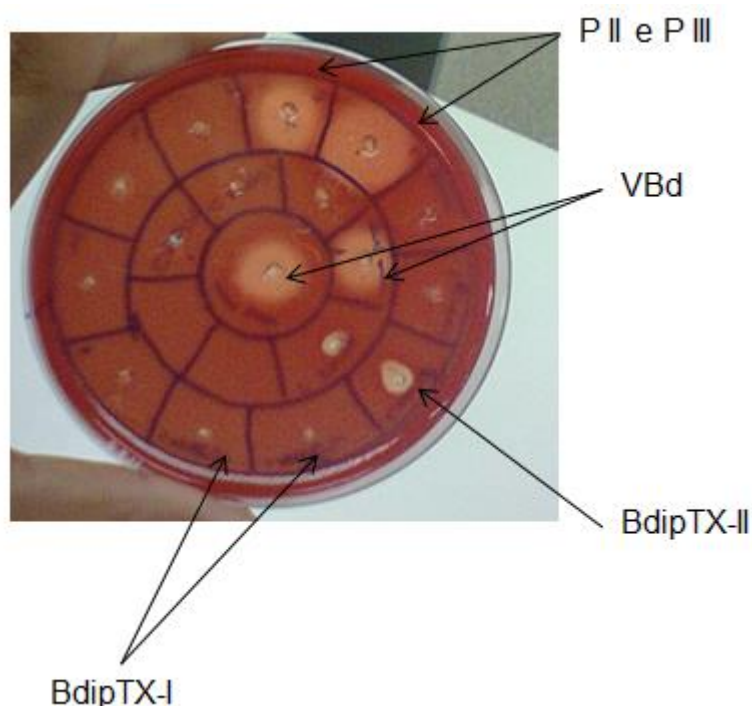


Figura 11. Atividade hemolítica indireta do VBd, frações e toxinas isoladas. Uma solução contendo 3 mL suspensão de hemácias (3 %), 150 μ L de CaCl_2 10 mM e 100 μ L de suspensão de gema de ovo 10 % (m/v) foi adicionada a uma solução composta de 180 mg de agarose e 15 mL de PBS. No gel formado foram feitos pequenos orifícios (2 mm) onde foram acrescentados 3 μ L de amostra. Após 12 horas de incubação a 37 °C verificou-se a formação de um halo translúcido ao redor do orifício, indicando a atividade indireta de PLA_2 nas amostras.

4.1.4 Atividade fosfolipásica direta

A atividade fosfolipásica direta, utilizando 4N3OAB como substrato, confirmou que BdipTX-I é enzimaticamente inativa, visto que as duas concentrações testadas (5 e 46 $\mu\text{g/mL}$) não apresentaram atividade. Por sua vez, tanto o VBd (42,5 $\mu\text{g/mL}$) quanto BdipTX-II (5 $\mu\text{g/mL}$) apresentaram atividade de catálise sobre o substrato testado, o que pode ser observado pelo aumento da DO em 425 nm, conforme a Figura 12 mostra.

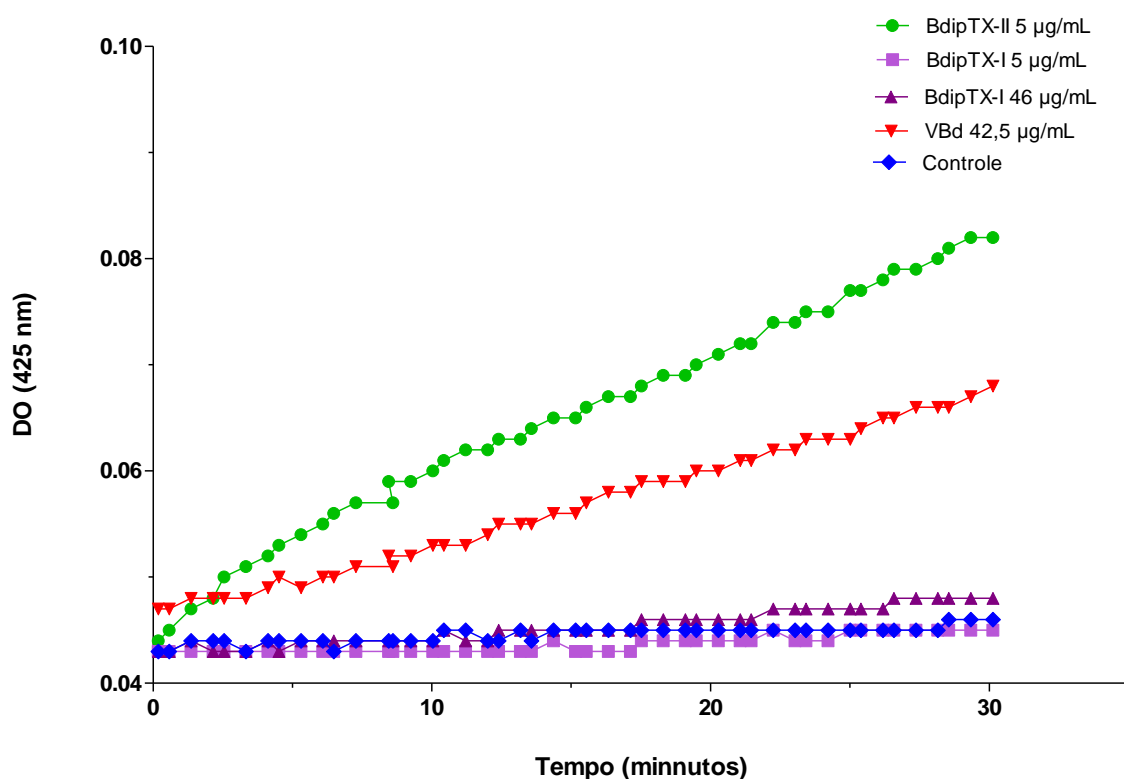


Figura 12. Atividade fosfolipásica do VBd, BdipTX-I e BdipTX-II sobre o 4N3OAB. Adicionou-se 190 μL de solução tampão contendo o substrato cromógeno 4N3OAB e 10 μL de amostras (VBd 42,5 $\mu\text{g/mL}$, BdipTX-I 5 e 42,5 $\mu\text{g/mL}$ e BdipTX-II 5 $\mu\text{g/mL}$) ou de água (controle negativo). A solução foi incubada a 37 °C e a leitura feita em espectrofotômetro a 425 nm em intervalos de 30 segundos durante 30 minutos. Os dados representam a D.O. da leitura cinética.

4.2 SEQUENCIAMENTO PARCIAL DE BdipTX-I

O sequenciamento parcial de BdipTX-I foi obtido em microsequenciador utilizando processo químico de sequenciamento por clivagem *N*-terminal, derivado do método desenvolvido por Pehr Edman. A sequência dos 68 primeiros aminoácidos de BdipTX-I revelou a presença de uma Lisina na posição 49, confirmando que a proteína isolada pertence a classe das sPLA₂s Lys-49 (TABELA 2).

TABELA 2– Sequência parcial de aminoácidos de BdipTX-I.

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
S	L	F	E	L	G	K	M	I	-	L	Q	E	T	G	K	N	P	A	K
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
S	Y	G	A	Y	G	C	N	C	G	V	L	G	R	G	K	P	K	E	A
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
T	Q	R	C	C	Y	V	H	K	C	C	Y	K	K	L	T	G	C	D	P
61	62	63	64	65	66	67	68	69											
K	K	D	R	Y	S	Y	S	W											

A sequência acima foi submetida à análise no banco de dados do NCBI (*National Center for Biotechnology Information*) por meio do programa BLAST 2.2.28+ (NCBI/ BLAST/ blastp suite/ Formatting Results- [ME0KWF8E014](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)). Pela análise foi possível fazer o alinhamento múltiplo com outras PLA₂ isoladas de venenos de serpentes (Figura 13).

PLA ₂	Espécie		Sequência de aminoácidos																				Identidade %	ID		
BdipTX-I	<i>B. diporus</i>	1	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	A	K	S	Y	G	49	lcl 89222
BthTX-I	<i>B. jararacossu</i>	1	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	A	K	S	Y	G	49	96 emb CAA55334.2
Miotoxina II	<i>B. asper</i>	1	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	A	K	S	Y	G	49	94 pdb 1CLP A
Bnsp-7	<i>B. pauloensis</i>	1	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	A	K	S	Y	G	49	94 pdb 1PA0 A
Piratoxina II	<i>B. pirajai</i>	1	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	A	K	S	Y	G	49	94 pdb 1QLL A
BbtX-II	<i>B. brazili</i>	1	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	A	K	S	Y	G	49	94 pdb 4K09 A
Bnsp-6	<i>B. pauloensis</i>	1	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	A	K	S	Y	G	49	94 pdb 1PC9 A
Bn IV	<i>B. neuwiedi</i>	1	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	A	K	S	Y	G	49	93 pdb 3MLM A
MjTX-II	<i>B. moojeni</i>	1	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	A	K	S	Y	G	49	93 pdb 1XXS A
blk-PLA2	<i>B. leucurus</i>	1	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	S	V	K	S	Y	G	49	90 sp P86975.1 PA2HB BOTLC
BaTX	<i>B. asper</i>	1	S	L	F	E	L	G	K	M	I	L	Q	E	T	G	K	N	P	A	K	S	Y	G	49	86 sp P86453.1 PA2HB BOTAL

PLA ₂	Espécie		Sequência de aminoácidos																				Identidade %	ID
BdipTX-I	<i>B. diporus</i>	50	C	Y	K	K	L	T	G	C	D	P	K	K	D	R	Y	S	S	W	68			lcl 89222
BthTX-I	<i>B. jararacossu</i>	50	C	Y	K	K	L	T	G	C	D	P	K	K	D	R	Y	S	S	W	68	97		emb CAA55334.2
Miotoxina II	<i>B. asper</i>	50	C	Y	K	K	L	T	G	C	N	P	K	K	D	R	Y	S	S	W	68	96		pdb 1CLP A
Bnsp-7	<i>B. pauloensis</i>	50	C	Y	K	K	L	T	G	C	D	P	K	K	D	R	Y	S	S	W	68	96		pdb 1PA0 A
Piratoxina II	<i>B. pirajai</i>	50	C	Y	K	K	L	T	G	C	N	P	K	K	D	R	Y	S	S	W	68	96		pdb 1QLL A
BbtX-II	<i>B. brazili</i>	50	C	Y	K	K	L	T	G	C	D	Q	K	K	D	R	Y	S	S	W	68	96		pdb 4K09 A
Bnsp-6	<i>B. pauloensis</i>	50	C	Y	K	K	L	T	G	C	D	P	K	K	D	R	Y	S	S	W	68	96		pdb 1PC9 A
Bn IV	<i>B. neuwiedi</i>	50	C	Y	K	K	I	T	G	C	D	P	K	K	D	R	Y	S	S	W	68	94		pdb 3MLM A
MjTX-II	<i>B. moojeni</i>	50	C	Y	K	K	L	T	G	C	D	P	K	K	D	R	Y	S	S	W	68	94		pdb 1XXS A
blk-PLA ₂	<i>B. leucurus</i>	50	C	Y	K	K	L	T	G	C	D	P	K	K	D	R	Y	S	S	W	68	91		sp P86975.1 PA2HB BOTLC
BaTX	<i>B. asper</i>	50	C	Y	K	K	L	T	G	C	N	P	K	K	D	R	Y	S	S	W	68	87		sp P86453.1 PA2HB BOTAL

Figura 13. Alinhamento múltiplo da sequência dos primeiros 68 aminoácidos de BdipTX-I com outras PLA₂ de venenos de serpentes. As sequências idênticas são destacadas com o fundo rosa e as similares com fundo amarelo.

4.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA DO VBd E DE BdipTX-I – EFEITOS LOCAIS E SISTÊMICOS

4.3.1 Edema

A formação do edema foi avaliada vários intervalos de tempo após a injeção intraplantar de VBd ou BdipTX-I, em diferentes doses (5 e 20 μg / pata), ou salina apirogênica (controle). Observou-se um aumento significativo do edema a partir de 0,5 h em todas as doses testadas (5 e 20 μg / pata) tanto para VBd quanto para BdipTX-I (Fig.14), com pico na 1 h e decaindo nas 24 h, efeito não observado na dose de 20 μg / pata de VBd.

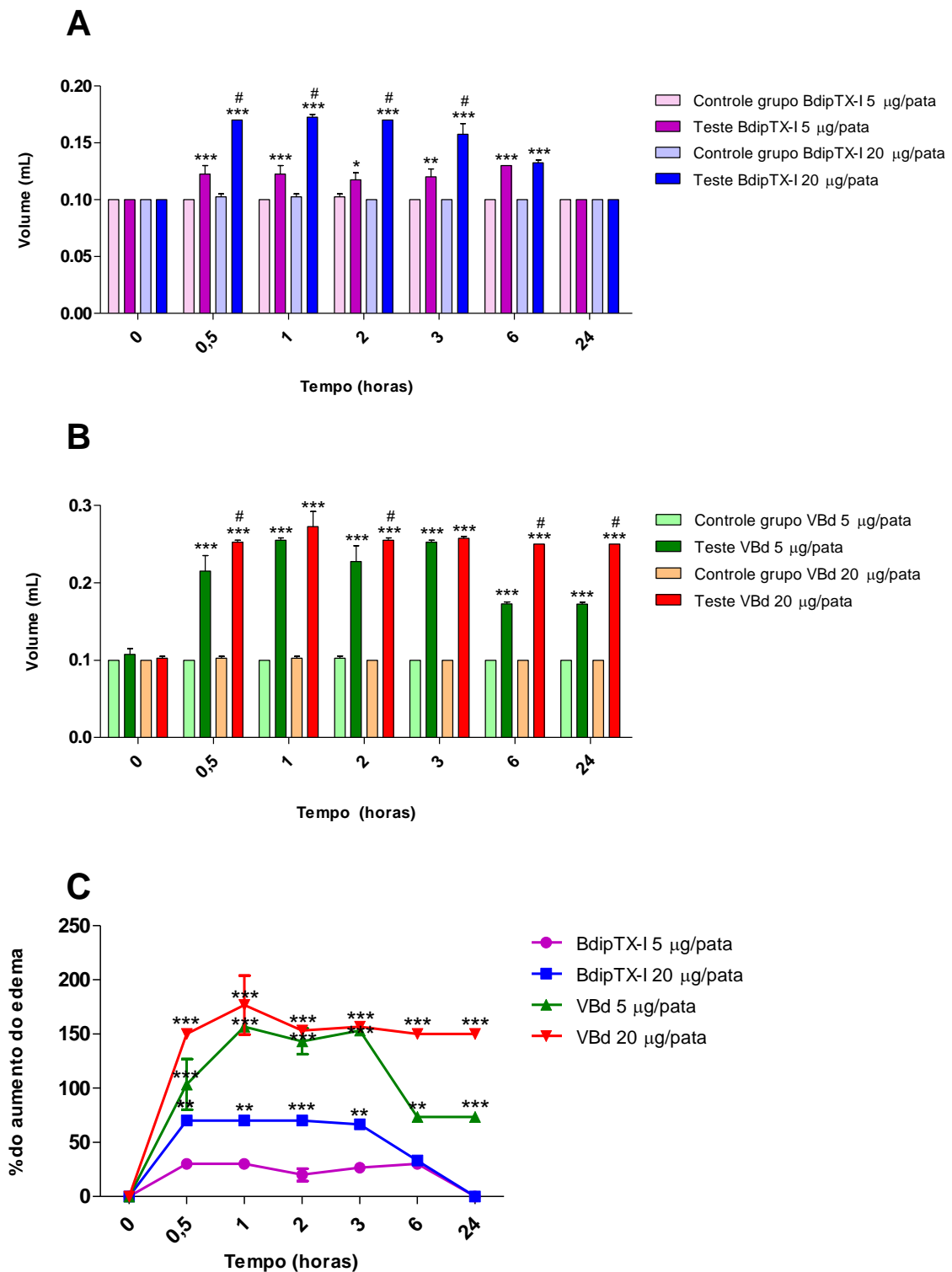


Figura 14. Atividade edematogênica do VBd e da BdiptTX-I em camundongos Swiss. Grupos de 4 animais foram inoculados no coxim plantar direito com 5 ou 20 µg de VBd ou BdiptTX-I. Como controle foi usada a pata contralateral esquerda, que recebeu injeção de salina estéril. O aumento no volume das patas inoculadas com as toxinas (patas testes) foi monitorado com um pletismômetro, nos tempos de 0, 0,5, 1, 2, 3, 6 e 24 horas. **A)** Atividade edematogênica de BdiptTX-I. **B)** Atividade edematogênica do VBd. **C)** Atividade edematogênica de BdiptTX-I e VBd em % do aumento do edema. Os dados foram expressos como média ± EPM, sendo * $p < 0,05$ em relação à pata controle (A e B) ou a BdiptTX-I 5µg/pata (C) e # $p < 0,05$ quando comparadas as duas doses testadas nas patas testes (ANOVA).

4.3.2 Atividade miotóxica

Para a avaliação da atividade miotóxica foram dosados os níveis séricos das enzimas CK total, CK-MB e LDH no plasma de camundongos *Swiss* que receberam a injeção i.m. de VBd e de BdipTx-I (50 µg / 20 µL de NaCl 150 mM). Os resultados obtidos mostraram que, comparados ao grupo controle, que recebeu apenas injeção i.m de solução salina estéril 150 mM, o VBd causou um aumento de 284 % e BdipTX-I de 127 % na atividade da CK-total. O grupo controle teve média de produção de CK de 859 U/L, VBd 3302,7 U/L e BdipTX-I 1954,8 U/L, sendo que tanto o aumento de CK sérico causado por VBd quanto BdipTX-I foram estatisticamente significantes em relação ao controle (Figura 15). Observa-se também que não houve aumento significativo dos níveis de CK-MB. Entretanto, houve um aumento na atividade da LDH tanto em animais tratados com o VBd quanto naqueles tratados com BdipTX-I. A média da atividade da LDH do grupo controle foi de 194 U/L, ao passo que VBd apresentou média de 516 U/L, o que corresponde a um aumento de 165,9 %, e o BdipTX-I teve média de 870 U/L, com aumento de 348,3 %. Sendo o aumento da atividade da LDH causada por BdipTX-I significativamente mais elevado em relação ao VBd.

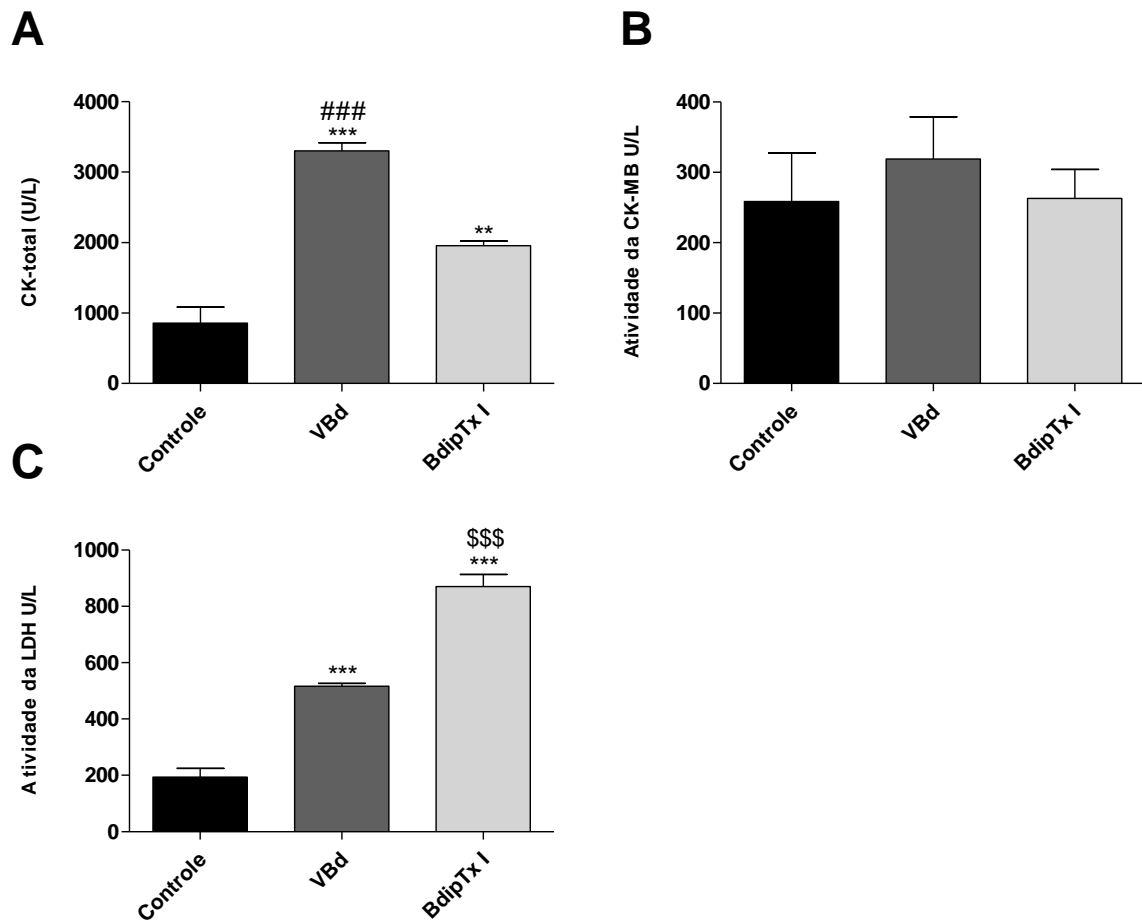


Figura 15. Efeito miotóxico do VBd e da BdipTX-I em camundongos *Swiss*. Foram injetados 50 µg de VBd ou BdipTX-I no músculo gastrocnêmico direito de camundongos *Swiss* (grupos de 5 animais). Os animais controle receberam 20 µL de solução salina estéril 150 mM. Após 3 horas, o sangue foi coletado e o plasma separado para determinação das atividades da CK-total (**A**), CK-MB (**B**) e LDH (**C**) utilizando-se Kits cinéticos CK-NAC, CK-MB Liquiform e LDH Liquiform (Labtest), respectivamente. Os dados foram expressos como média ± EPM. * $p < 0,05$ em relação ao controle. # $p < 0,05$ em relação a BdipTX-I em **A** e \$ $p < 0,05$ em relação a VBd em **C** (ANOVA).

4.3.3 Efeitos sobre a função hepática

O efeito do VBd e de BdipTX-I sobre a função hepática dos camundongos foi avaliado pela análise da alteração das enzimas: AST, ALT, GGT e FAL. Na Figura 16 é possível observar que a AST foi a única enzima que apresentou alteração nos níveis séricos. O VBd (305 U/L) induziu um aumento de 216,6 % nos níveis de AST, enquanto BdipTX-I (389,3 U/L) causou um aumento de 304 %, quando comparados ao controle (96,3 U/L). Em relação aos demais marcadores não houve alteração significativa.

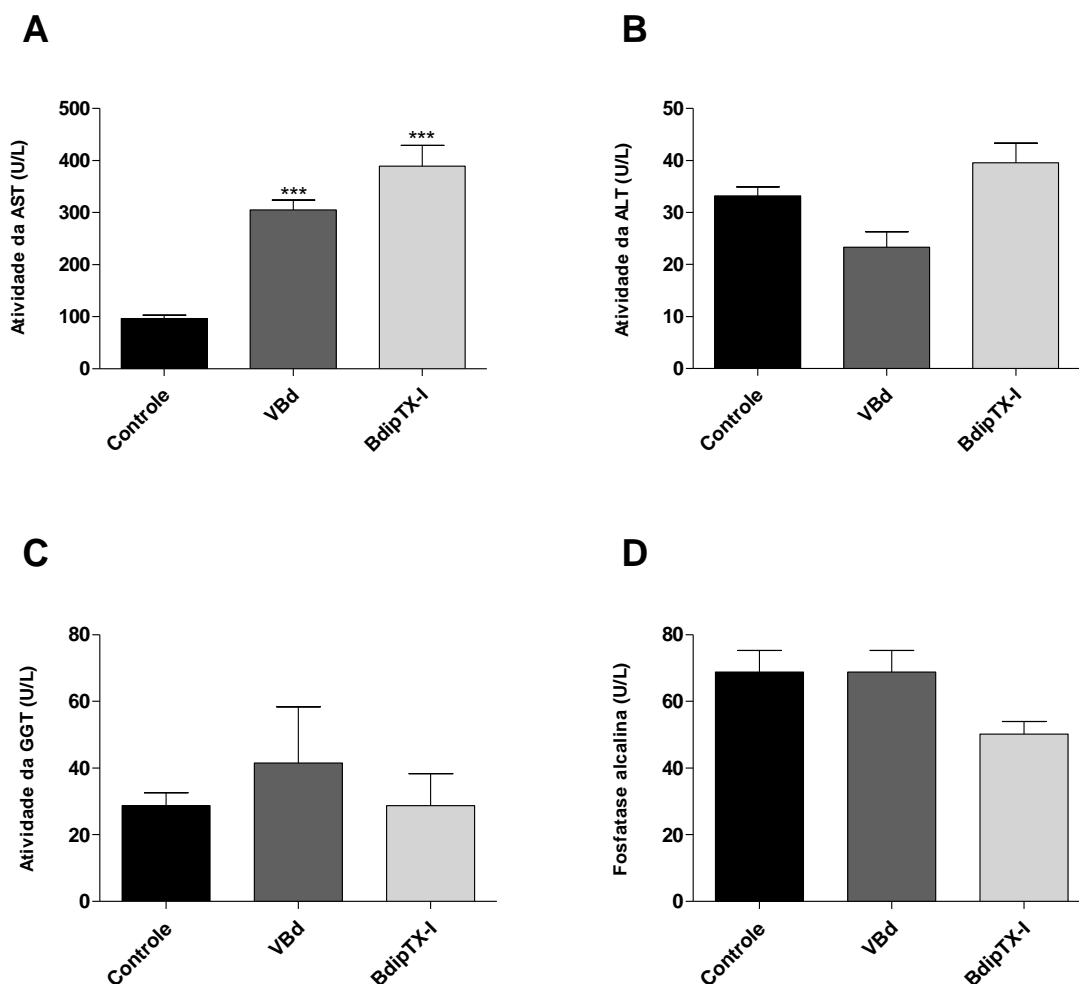


Figura 16. Efeito do VBd e da BdipTX-I sobre a função hepática de camundongos Swiss. Foram usadas amostras de plasma coletadas de grupos de 5 animais após 3 horas da injeção i.m. de 50µg do VBd ou de BdipTX-I ou somente salina (grupo controle). **A)** Atividade da AST (U/L) dosada com kit AST/GOT Liquiform (Labtest). **B)** Atividade da ALT (U/L) avaliada com kit ALT/GPT Liquiform (Labtest). **C)** Atividade da GGT dosada com Kit GAMA GT Liquiform (Labtest). **D)** Atividade da fosfatase alcalina avaliada com Kit Fosfatase Alcalina (Labtest). Os dados foram expressos como média ± EPM. *p< 0,05 em relação ao controle (ANOVA).

4.3.4 Efeitos sobre a função renal

O efeito de VBd e BdipTX-I sobre a função renal dos camundongos foi avaliado a partir da dosagem de uréia e creatinina (presentes no plasma e na urina), e excreção de proteínas e cálcio na urina. De acordo com a Figura 17 pode-se observar que somente o VBd induziu excreção de ureia na urina e no plasma dos camundongos. Em contrapartida, BdipTX-I foi capaz de induzir aumento significativo dos níveis urinários de creatinina e proteínas totais, indicando possível lesão renal, que também pode ser atribuída ao VBd. Os níveis séricos de creatinina e cálcio urinário não foram alterados. A Tabela 3 mostra a média e o percentual do aumento causado pela alteração dos marcadores de lesão renal pelo VBd e pela BdipTX-I.

TABELA 3-Marcadores de lesão renal alterados pelo VBd e BdipTX-I.

Marcador	Controle	VBd		BdipTX-I	
	Média (mg/dL)	Média (mg/dL)	% aumento	Média (mg/dL)	% aumento
Ureia sérica	45,2	92,3	104,0	51,6	14,2
Ureia urinária	6475,3	9454,1	46,0	6144,0	-5
Creatinina urinária	11,1	40,3	262,5	27,1	143,7
Proteínas urinárias	983,8	1985,4	101,8	1773,5	80,3

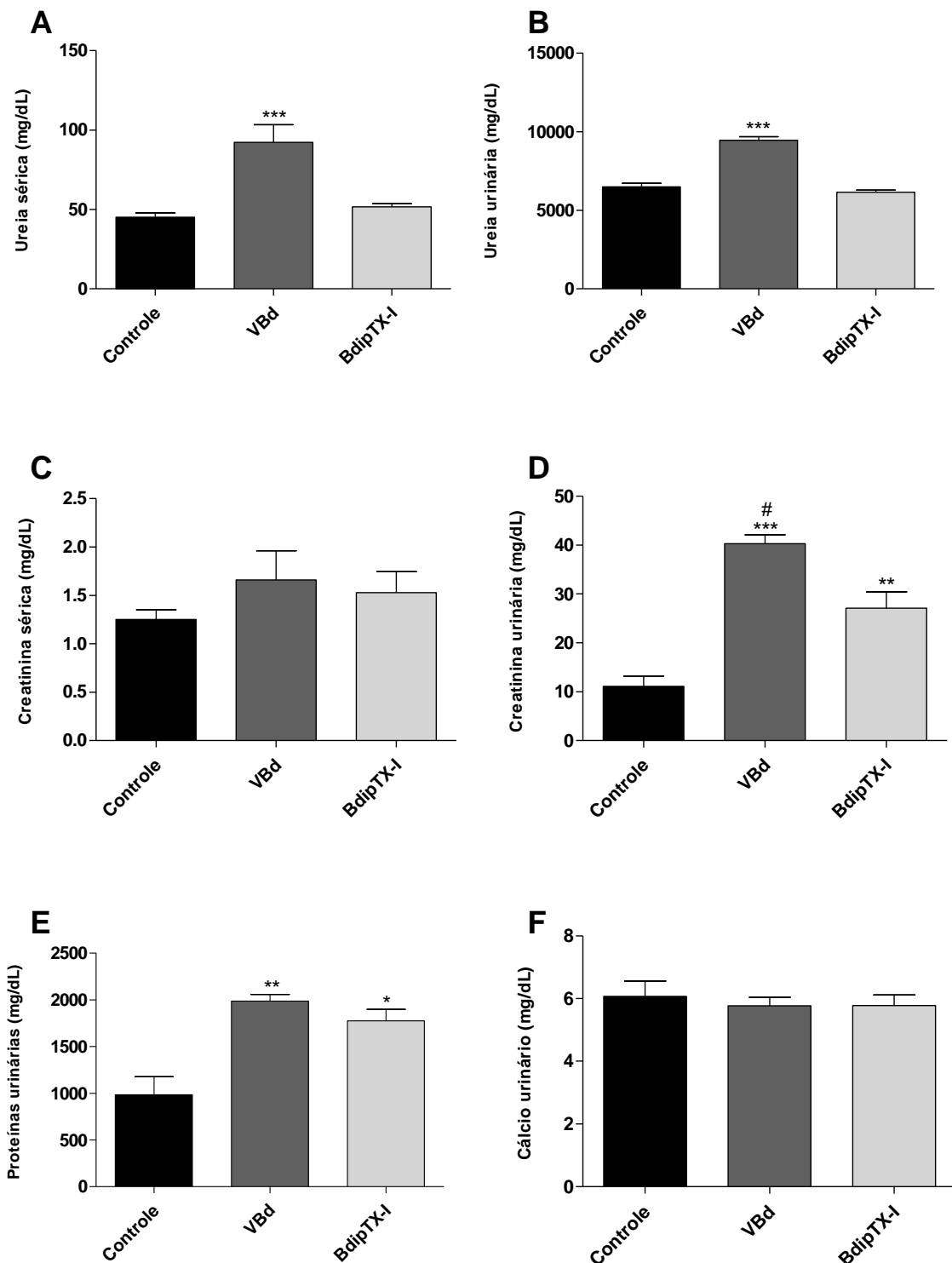


Figura 17. Efeito do VBd e da BdipTX-I sobre a função renal de camundongos *Swiss*. Foram usadas amostras de plasma coletadas de grupos de 5 animais após 3 horas da i.m. de 50 µg do VBd ou de BdipTX-I ou salina (grupo controle). **A)** Uréia sérica (mg/dL) dosada com Ureia CE (Labtest). **B)** Uréia urinária (mg/dL) avaliada com kit Uréia CE (Labtest). **C)** Creatinina sérica (mg/dL) dosada com kit Creatinina Cinética (Bioclin). **D)** Creatinina urinária (mg/dL) dosada com kit Creatinina Cinética (Bioclin). **E)** Excreção de proteínas na urina dosada com Kit SENSIPROT (Labtest). **F)** Excreção de cálcio na urina dosada com Kit Cálcio Liquiform (Labtest). Os dados foram expressos como média ± EPM. *p < 0,05 em relação ao controle e #p < 0,05 em relação a BdipTX-I (ANOVA).

5 DISCUSSÃO

As PLA₂ são proteínas presentes em quantidades consideráveis nos venenos de serpentes, particularmente nas do gênero *Bothrops*. Elas estão diretamente relacionadas com a fisiopatologia do envenenamento, pois são responsáveis por diversos distúrbios locais e sistêmicos, que incluem a miotoxicidade, efeitos pró-inflamatórios como indução de edema, recrutamento leucocitário, ativação de leucócitos, liberação de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF- α , além de induzir lesões renais, cardiovasculares e neurológicas (ZULIANI et al., 2005a; ZULIANI et al., 2005b; GUTIÉRREZ et al., 2008; PONCE-SOTO e MARTINS-DE-SOUZA, 2010; TOYAMA et al., 2011; MARANGONI et al., 2013; RUEDA et al., 2013; SETUBAL et al., 2013). Além disso, sabe-se que as sPLA₂ possuem estruturas primárias altamente conservadas, o que significa que as sPLA₂vs possuem homologia com as sPLA₂ de mamíferos, podendo o estudo de seus mecanismos de ação contribuir para o entendimento do papel das sPLA₂ em diversas patologias. Por estes motivos, o presente estudo teve como alvo uma sPLA₂ isolada do veneno de *B. diporus*, onde sua ação foi comparada ao veneno bruto nos efeitos locais e sistêmicos.

As sPLA₂ básicas isoladas no presente estudo, BdipTX-I e BdipTX-II, são inéditas na espécie *B. diporus*. Os testes enzimáticos de atividade fosfolipásica com diferentes substratos (Figuras 11 e 12) demonstraram que BdipTX-II é enzimaticamente ativa e, possivelmente, trata-se de uma PLA₂ Asp-49. Contudo, em virtude da pequena quantidade de proteína isolada, não foi possível a realização dos testes biológicos e o sequenciamento de BdipTX-II. Por outro lado, foram sequenciados os primeiros 68 aminoácidos de BdipTX-I, o que revelou a presença de uma Lys na posição 49, confirmando a inatividade enzimática previamente observada nos testes de atividade fosfolipásica. Com base nesses dados, pode-se afirmar que BdipTX-I é uma sPLA₂ básica Lys-49 com cerca de 14KDa.

Diversas sPLA₂ básicas do tipo Lys-49 já foram isoladas de venenos de serpentes, sendo que a maioria possui entre 120 e 138 resíduos de aminoácidos em sua estrutura primária e o peso molecular varia entre 10 e 15KDa, como pode ser observado na TABELA 4.

TABELA 4 - sPLA2 Lys-49 isoladas do veneno de serpentes.

Denominação	Espécie	Peso molecular (KDa)	Resíduos de aminoácidos	Referência
BmjeTX-I	<i>Bothrops marajoensis</i>	14	*	PONCE-SOTO et al., 2010.
BmjeTX-II	<i>Bothrops marajoensis</i>	14	*	PONCE-SOTO et al., 2010.
BnSP-7	<i>Bothrops pauloensis</i>	*	121	FONTES et al., 1999.
Bp-12	<i>Bothrops pauloensis</i>	13,8	122	RANDAZZO-MOURA et al., 2008.
BmTX-I	<i>Bothrops moojeni</i>	14	121	CALGAROTTO et al., 2008.
Bn-IV	<i>Bothrops neuwiedi</i>	14	120	TOYAMA et al., 2011.
BaTX	<i>Bothrops alternatus</i>	14	121	PONCE-SOTO et al., 2007.
BthTx-I	<i>Bothrops jararacussu</i>	13,7	121	CINTRA et al., 1993.
Miotoxina II	<i>Cerrophidion (Bothrops) godmani</i>	*	121	DE AZEVEDO et al., 1998.
Acutohaemolysin	<i>Agkistrodon acutus</i>	*	122	LIU et al., 2003.
Miotoxina I	<i>Bothrops asper</i>	10,7	122	GUTIÉRREZ et al., 1984.
BP-II, Proteína II	<i>ProtoBothrops flavoviridis</i>	*	138	LIU et al., 1990.
Myotoxin II	<i>Bothrops asper</i>	13,3	137	LOMONTE et al., 1989.

Miotoxina II	<i>Bothrops Moojeni</i>	14	122	DE AZEVEDO et al., 1998.
APP-K-49	<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>	*	121	MARAGANORE e HEINRIKSON, 1986.
TMV-K49	<i>ProtoBothrops mucrosquamatus</i>	*	122	LIU et al., 1991.
BP-III	<i>ProtoBothrops flavoviridis</i>	*	138	MURAKAMI et al., 2009.
Miotoxina IVa	<i>Bothrops asper</i>	*	137	LIZANO et al., 2001.
Myotoxin II	<i>Bothriechis schlegelii</i>	15	137	ÂNGULO et al., 1997.
Cax-K49	<i>Crotalus atrox</i>	*	137	TSAI et al., 2001.
Pgo-K49	<i>Cerrophidion godmani</i>	*	137	TSAI et al., 2001.
*	<i>Deinagkistrodon acutus</i>	*	138	FAN et al., 1999.
BaTX	<i>B. asper</i>	14	121	PONCE-SOTO et al., 2007.

* Dado não descrito pelos autores.

Dentre essas fosfolipases, o alinhamento múltiplo da sequência parcial de BdiPTX-I revelou uma grande identidade em sua sequência primária de aminoácidos com outras PLA₂ isoladas de serpentes do gênero *Bothrops*, como BthTX-I de *B. jararacussu*, Miotoxina II de *B. asper*, Bnsp-6 e BnsP-7 de *B. pauloensis*, Piratoxin-II de *B. pirajai*, BbtX-II de *B. brazili*, Bn IV de *B. neuwiedi*, MjTX-II de *B. moojeni*, bIK-PLA₂ de *B. leucuros* e BaTX de *B. alternatus* (Figura 13). Também foi possível observar que BdiPTX-I possui resíduos de aminoácidos conservados na região N-terminal, que é constituinte da região de α -hélice da proteína e também contém resíduos que atuam no sítio de ligação ao substrato (posições Leu-5 e Phe-22), que é um elemento importante na ação miotóxica dessas proteínas (CHAVES *et al.*, 1992; ARNI e WARD, 1996).

BdipTX-I, assim como o VBd, demonstraram ter atividade edematogênica (Figura 14). Esse efeito já foi observado em outras PLA₂ isoladas e venenos ofídicos, em especial do gênero *Bothrops* (KNI, 1997; PONCE-SOTO *et al.*, 2007; MARANGONI *et al.*, 2013). Os efeitos edematogênicos tanto do VBd quanto de BdipTX-I foram semelhantes aos de outros venenos botrópicos e PLA₂ isoladas (ZYCHAR *et al.*, 2010; HUANCAHUIRE-VEGA *et al.*, 2011). Sendo que, a formação do edema mostrou-se dose-dependente para BdipTX-I, mas não para o VBd (Figura 14). Um estudo realizado anteriormente com o VBd mostrou que o veneno possui dose edematogênica mínima (DEM) de 2,05µg/pata (PÉREZ *et al.*, 1998). No mesmo estudo, a análise histopatológica do tecido dos animais inoculados com 5µg de VBd mostrou ação necrosante e infiltrado de células polimorfonucleares em fibras musculares.

No presente estudo não foram estabelecidas as alterações teciduais ou a presença de mediadores inflamatórios no edema causado pelo VBd ou pela toxina BdipTX-I. Contudo, dados da literatura demonstram que a atividade edematogênica das sPLA₂vs e venenos de serpentes é caracterizada pelo extravasamento de fluídos e proteínas plasmáticas, causado por alterações na permeabilidade vascular das vênulas da microcirculação presentes no local da lesão (BARBOSA *et al.*, 2003; HUANCAHUIRE-VEGA *et al.*, 2011). Estas alterações estão relacionadas à degranulação de mastócitos e ativação de receptores de vasodilatadores como a histamina, responsável pela permeabilidade vascular e ativação de células endoteliais (BARBOSA *et al.*, 2003).

Além disso, como demonstra a literatura, o edema causado pelo veneno bruto é potencializado devido à presença de outros componentes como as proteases (serinoproteases e metaloproteases) e L-AAO (GAY *et al.*, 2005; PÉREZ *et al.*, 2007; ZYCHAR *et al.*, 2010). VBd, assim como a maioria dos venenos botrópicos, possui atividade preteolítica e de LAAO (dados não mostrados) e, como pode ser observado na Figura 14, o edema causado por VBd é significativamente mais elevado que o causado pela mesma dose de BdipTX-I. A presença dessas outras proteínas também pode ser observada na eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 % realizada com VBd e suas frações obtidas após cromatografia de troca iônica, na qual é possível observar bandas com peso molecular de aproximadamente 30 KDa tanto em VBd quanto na fração P V, indicando a presença de uma protease (Figura

7). Na mesma ilustração observa-se uma banda em torno de 60 KDa em VBd e na feação P II, a qual pode indicar a presença de uma LAAO.

Salienta-se ainda, que como vem sendo demonstrado pela literatura, a atividade edematogênica das sPLA₂vs independe da ação enzimática, sendo que diversas miotoxinas Lys-49 são edematogênicas (PONCE-SOTO et al., 2007; CALGAROTTO et al., 2008; HUANCHUIRE-VEGA et al., 2011). Para BdipTX-I, uma sPLA₂sv Lys-49, não foi diferente. Inicialmente acreditava-se que a formação do edema estava diretamente relacionada com a produção de mediadores lipídicos, como as PGE₂, leucotrienos e tromboxanos derivados da liberação do ácido araquidônico proveniente da clivagem de fosfolípidos de membrana pela ação enzimática das sPLA₂vs (KINI, 2003). Estudos demonstram que no caso das sPLA₂vs Asp-49 esse mecanismo contribui para a formação do edema, bem como para o estabelecimento da reação inflamatória (DENNIS, 1987; CIRINO et al., 1989; CHAVES et al., 1998;). Contudo, a ação enzimática não é essencial para indução do edema. ANDRIÃO-Escarso e colaboradores (2000) demonstraram uma redução em torno de 50% no edema causado por BthTX-II, uma sPLA₂sv Asp-49 isolada de *B. jararacussu*, após modificação química dos resíduos de histidina por ação do BPB. Mas o bloqueio da ação enzimática não impediu por completo a atividade edematogênica da toxina, sugerindo que há outros mecanismos envolvidos.

Quanto às sPLA₂vs Lys-49, os mecanismos necessitam de maiores esclarecimentos. Mas, é possível que, assim como a atividade miotóxica dessas toxinas está relacionada à sua região C-terminal, a indução do edema possa ocorrer por mecanismos semelhantes, no qual a ligação inicial da região C-terminal a membrana plasmática desencadeia uma série de eventos que causam desordens na membrana, influxo de Ca²⁺ e indução de sinais intracelulares que culminam com a liberação de mediadores inflamatórios como as citocinas (CHIOATO e WARD, 2003; AMBROSIO et al., 2005). Essa hipótese sustenta-se com base em estudos como de Lomonte e colaboradores (1994), no qual peptídeos sintéticos produzidos com base na região C-terminal da Miotoxina II de *B. asper* demonstraram atividade tóxica.

A atividade miotóxica de BdipTX-I e VBd foi avaliada pela dosagem dos níveis séricos de CK-total. A CK é uma isoenzima presente nos tecidos musculares e envolvida na reserva de energia. Durante a contração muscular, a creatina-fosfato é convertida em creatina e ATP, e assim a energia da célula é repostada. Durante o repouso, a reação inversa ocorre, e ATP é convertido pela CK em creatina-fosfato

que serve de reservatório energético (APPLE et al., 1984; ARENAS *et al.*, 1988). Sendo a CK uma enzima intracelular, sua liberação na corrente sanguínea normalmente decorre de lesão às células do músculo esquelético.

Como já era esperado, a atividade da CK-total após a injeção i.m. de BdipTX-I e VBd (50µg/20µL de salina) foi bastante acentuada (Figura 15 A). Em relação à BdipTX-I, o VBd foi significativamente mais miotóxico. Como já foi dito anteriormente, isso ocorre, provavelmente, devido à presença dos demais componentes do veneno. Somado a dosagem de CK-total, o efeito miotóxico de BdipTX-I e VBd também pode ser constatado pela dosagem de LDH sérico (Figura 15 C), na qual BdipTX-I demonstrou um efeito significativamente maior que VBd.

A LDH, por sua vez, faz parte da via glicolítica de todas as células do organismo. Ela catalisa a oxidação reversível do lactato a piruvato, na presença da coenzima NAD⁺, que pode ser doadora ou aceptora de prótons. A LDH possui cinco isoformas que são formadas a partir da combinação tetramérica de suas subunidades H (miocárdio) e M (músculo). Dessa forma existem cinco isoformas de LDH: LDH-1 (HHHH) e LDH-2 (HHHM), predominantes no miocárdio e eritrócitos; LDH-3 (HHMM), encontrada nos pulmões, linfócitos, baço e pâncreas; e LDH-4 (HMMM) e LDH-5 (MMMM), presentes no fígado e no músculo esquelético. LDH é encontrada cerca de 500 vezes mais concentrada nos tecidos do que no soro, portanto, seu aumento sérico é um indício de lesão tecidual. E apesar da sua imprecisão, quando associada a outros marcadores específicos, o aumento dos níveis de LDH no soro podem ser devido a lesões musculares, cardíacas, hepáticas e renais (COPUR et al., 1989; CASSDY et al., 1994).

Comparados a outras sPLA₂s e venenos, parece não ter havido um padrão comportamental na ação de BdipTX-I e VBd, visto que as PLA₂ isoladas foram mais miotóxicas que os respectivos venenos brutos (TABELA 5). É possível observar também que com relação a uma PLA₂ isolada de *B. pauloensis* testada na mesma dose (50 µg/animal), BdipTX-I teve valores menores de CK-total. Estes dados podem indicar uma atividade miotóxica moderada de BdipTX-I. Em contrapartida, o VBd quando comparado a outros cuja a dose testada foi mesma, como o de *B. pauloensis* e *B. atrox*, apresentou valores mais elevados de CK-total. Essa diferença provavelmente está relacionada à variabilidade da composição dos venenos das diferentes espécies (GUTIÉRREZ et al., 2006; SHASHIDHARAMURTHY et al., 2010; ADUKAUSKIENĖ et al., 2011).

TABELA 5 – Miotoxicidade de algumas sPLA₂ Lys-49 isoladas do veneno de serpentes.

Espécie	Quantidade utilizada (µg)	CK-total (U/L) do veneno	CK-total (U/L) PLA₂ isolada	Referencia
<i>B. diporus</i>	50	3302,7	1954,8	
<i>B. neuwiedi</i>	25	721	1500	TOYAMA et al., 2011.
<i>B. alternatus</i>	20	-	1400	PONCE-SOTO et al., 2007.
<i>B. pauloensis</i>	50	515, 4	3747,3	OLIVEIRA et al., 2009.
<i>B. moojeni</i>	20	~320	~400	CALGAROTTO et al., 2008.
<i>B. jararacussu</i>	100	-	~2500	ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000.
<i>B. atrox</i>	50	2125	-	SOUZA et al., 2012.

-Não foram testados nos referidos trabalhos.

A atividade miotóxica de sPLA₂vs Lys-49 vem sendo alvo de diversos estudos (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000; PONCE-SOTO et al., 2007; CALGAROTTO et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; TOYAMA et al., 2011). Investigações iniciais apontaram que a interação entre a região C-terminal das sPLA₂vs, rica em resíduos catiônicos, e os fosfolípidios da membrana é essencial para atividade miotóxica dessas proteínas (LOMONTE et al., 1994; LOMONTE et al., 1999; NÚÑEZ et al., 2001). Lomonte e colaboradores (2003) demonstraram que peptídeos sintéticos derivados da região C-terminal (aminoácidos 115-129) de sPLA₂vs Lys-49 isoladas de *Agkistrodon piscivorus piscivorus* são capazes de induzir elevação nos níveis CK sérico em camundongos. Sá e colaboradores (2004), utilizando ensaios de mutagênese em BthTX-I, demonstraram a importância da existência de um sítio de ligação ao substrato que age em conjunto com a região C-terminal da proteína na atividade miotóxica dessa PLA₂. Esses e outros estudos

reforçam a ideia de que a ação miotóxica da sPLA₂sv Lys-49 depende de uma interação da proteína com os fosfolipídios da membrana plasmática.

Além disso, estudos posteriores demonstraram que a atividade miotóxica está relacionada à existência de receptores específicos nas células do músculo esquelético (GUTIÉRREZ E OWINBY, 2003). Fato que explicaria as ações diversificadas dessas proteínas. Gutiérrez e colaboradores (2008), por exemplo, demonstraram que uma PLA₂ Lys-49 isolada de *B. alternatus* possui elevada atividade miotóxica local quando aplicada no tecido muscular, contudo não foi observado o mesmo efeito sistemicamente quando a toxina foi injetada por via intravenosa. Porém, no mesmo estudo foi verificado que a crotoxina de *Crotalus durissus terrificus* possui atividade tanto local quanto sistêmica. Esses fatos, segundo os autores, são devido à existência de receptores os quais a PLA₂ de *B. alternatus* não teria tido acesso por via i.v., indicando que sua ligação ocorre a receptores musculares.

Do mesmo modo, diversos trabalhos tem demonstrado que os venenos de serpentes e também as PLA₂ induzem lesões em nível sistêmico, podendo atingir o funcionamento de órgãos vitais como o coração, o fígado e os rins tanto em vítimas humanas como também em animais utilizados em modelos experimentais (AMARAL et al., 1986; BARBOSA et al., 2002; PEICHOTO et al., 2006; GAMA, 2009; SHASHIDHARAMURTY et al., 2010; SOUZA et al., 2012; PATIL et al., 2012; DIAS et al., 2012). Por este motivo, depois de constatado que BdipTx-I e VBd possuem efeitos locais edematogênico e miotóxico, o efeito sistêmico a partir da lesão local foi investigado. Para tanto, foram avaliadas as lesões hepáticas e renais pela dosagem de marcadores laboratoriais específicos.

O choque cardiovascular causado por hipovolemia associada a alterações hemodinâmicas é uma das principais causas de mortalidade do envenenamento botrópico (GUTIÉRREZ et al., 1995; WARREL, 2004). As alterações hemodinâmicas são causadas pela presença de substâncias hemorrágicas, anticoagulantes, coagulantes e vasodilatadoras, como as metaloproteases, PLA₂, serinoproteases, L-AAO e proteínas não enzimáticas (lectinas do tipo C) (KINI, 2006; GUTIÉRREZ et al., 2009; DIAZ et al., 2012).

Tendo em vista esse conhecimento da literatura, associado ao fato de que CK-MB está presente exclusivamente no músculo cardíaco, sendo que níveis séricos elevados de CK-MB normalmente são encontrados no soro de pacientes que

tiveram alguma lesão nas células do miocárdio, como por exemplo, no infarto agudo do miocárdio (BHAYANA et al., 1993), alterações nos níveis séricos dessa enzima nos camundongos testados poderiam indicar uma possível lesão cardíaca. Já a LDH, possui cinco isoformas, das quais uma está presente no coração, podendo também ser utilizada para avaliar a lesão cardíaca, mas não como marcador específico. Em estudo realizado por Shashidharamurty e colaboradores (2010) com a injeção intraperitoneal (i.p.) do veneno de *Naja naja* em camundongos, foi observada lesão cardíaca caracterizada pela necrose do musculo cardíaco acompanhada do aumento nos níveis de CK-MB e TGO. Evangelista e colaboradores relatam os efeitos cardiovasculares após injeção intravenosa (i.v.) de uma PLA₂ isolada do veneno de *B. marajoensis*, caracterizados pelas diminuições da pressão arterial e da frequência cardíaca.

Contudo, como pode ser observado na Figura 15 B, os níveis de CK-MB não foram alterados por BdipTX-I ou VBd. E, apesar da atividade da LDH ter sido bastante elevada, principalmente para BdipTX-I, não se pode afirmar que houve lesão cardíaca somente com os dados obtidos até esta data. Uma análise histológica do musculo cardíaco poderia fornecer maiores informações a respeito dessa problemática. Além disso, é provável que os níveis de LDH tenham sido alterados devido à atividade miotóxica ou mesmo por uma possível lesão renal, visto que a LDH está presente também nas células do musculo esquelético e nos rins.

Quanto à lesão hepática foram feitos testes cinéticos com kits laboratoriais de diagnóstico para avaliar os níveis de AST, ALT, GGT e FAL no soro dos camundongos. As aminotransferases ou transaminases, AST e ALT, são enzimas que catalisam a transferência reversível dos grupos amino de um aminoácido para o 2-oxoglutarato, originando cetoácido e ácido glutâmico. AST e ALT são encontradas em grandes quantidades no citoplasma dos hepatócitos, sendo que a maior parte da AST está presente na mitocôndria das células hepáticas. Embora essas enzimas não sejam exclusivas do fígado (sendo encontradas em outros órgãos como coração, musculo esquelético e, em pequenas quantidades, nos rins, pâncreas, baço, cérebro, pulmões e eritrócitos), elas são liberadas primariamente durante a lesão aos hepatócitos (KIM et al., 1977; SINGER et al., 1995; JONHSON et al., 1995; SHETH et al., 1998). Já as enzimas GGT e FAL estão envolvidas em obstruções hepatobiliares, pois estão localizadas nos canalículos das células hepáticas. A GGT catalisa a transferência de um grupo γ -glutamil de um

peptídeo para outro peptídeo ou aminoácido, originando aminoácidos γ -glutamil e cistetil-glicina. A principal fonte de GGT é fígado, porém a enzima pode ser encontrada em outros órgãos como rins, intestinos, próstata, pâncreas, pulmões, cérebro e coração (MOUSSAVIAN et al., 1985; NEMESANSZKY et al., 1985). Já a FAL é uma enzima que catalisa a hidrólise de fosfomonoésteres em pH alcalino. Também está presente em diversos órgãos, incluindo o fígado, os rins, intestino delgado, baço, ossos, leucócitos e placenta (ALPERS et al., 1988; DENG et al., 1992).

Como se pode observar na Figura 16, somente os níveis de AST foram significativamente alterados tanto por BdipTX-I quanto por VBd. Considerando que AST e ALT são as primeiras enzimas liberadas durante uma lesão hepática aguda, é possível que as toxinas estejam causando hepatotoxicidade. Estudo com outros venenos de serpentes mostraram alterações nos níveis de AST e ALT relacionados à lesão hepática (SHASHIDHARAMURTY et al., 2010; SOUZA et al., 2012). Os mecanismos envolvidos na lesão ainda não foram estabelecidos. Mas, alguns trabalhos observaram além das alterações bioquímicas, achados histológicos que revelaram a presença de: necrose; alterações nucleares e citoplasmáticas, que incluem cariopícnose de hepatócitos e vacuolização citoplasmática; congestão dos vasos sanguíneos e trombose da veia porta; amiloidose e atrofia dos hepatócitos; e ativação das células de Kupffer (JARRAR, 2010; SHASHIDHARAMURTY et al., 2010; SILVA, 2012 et al., 2012). Logo, é possível que a hepatotoxicidade seja um efeito secundário da ação do veneno, como por exemplo, da diminuição do fluxo sanguíneo nos sinusoides hepáticos que levaria hipóxia e consequentemente a morte celular, ou também um efeito direto da ação das PLA₂ sobre os hepatócitos.

Porém, AST não é uma enzima presente exclusivamente nas células hepáticas. Sendo assim, não se pode afirmar com exatidão que BdipTX-I e VBd causam lesão hepática nos animais testados, no período de tempo avaliado. Além disso, cabe mencionar que a AST, assim como a LDH, são enzimas presentes também no miocárdio, no entanto o principal marcador de lesão cardíaca, CK-MB, não foi alterado. Sendo assim, experimentos adicionais necessitam ser realizados para maiores esclarecimentos.

Para avaliar se BdipTX-I e VBd causam toxicidade renal, foram avaliados os níveis séricos e urinários de ureia e creatinina e também excreção de proteínas e cálcio na urina. A amônia proveniente do catabolismo proteico é convertida em ureia

no fígado. Nos rins ela é filtrada nos glomérulos e excretada na urina, embora 40 a 70% sejam reabsorvidos por difusão passiva pelos túbulos. Níveis elevados de ureia estão associados a disfunções renais, enquanto que níveis reduzidos no soro indicam disfunção hepática (DEEN et al., 1979; BERK e STAMP, 1999;). A creatinina é um produto da desidratação não enzimática da creatina presente no músculo e, após difusão do músculo para o plasma é quase totalmente removida por filtração glomerular. Valores aumentados de creatinina sérica são indicativos de lesão glomerular (FINN, 1990; GASPAI et al., 1997). Já valores aumentados de proteínas na urina são os primeiros indícios de lesão tubular proximal e também lesão glomerular (SHIHABI et al. 1991; SCHUREK, 1994). Alterações nos sais urinários, como o cálcio também podem indicar lesão renal (GUDER e HOFFMAN, 1992; RAHN et al., 1999).

Conforme observado na Figura 17, houve um aumento significativo nos níveis de ureia séricos e urinários causado por VBd, mas não por BdipTX-I. Também foram aumentados os níveis urinários de creatinina tanto por BdipTX-I quanto por VBd, acompanhado de uma elevada proteinúria. Esses dados indicam que pode estar havendo um efeito nefrotóxico tanto por BdipTX-I quanto por VBd. Contudo, o fato de BdipTX-I não apresentar o mesmo efeito do VBd quanto à elevação dos níveis séricos de ureia dos camundongos é um indicativo da ação de outros componentes do veneno na indução de uma possível lesão renal. Pois a uremia, provavelmente, é devida ao aumento na produção de amônia, que pode ter sido causada pela ação dos componentes proteolíticos do VBd. Além disso, a creatinina sérica não foi alterada por BdipTX-I ou VBd, mas alterações significativas foram observadas na urina dos animais testados em relação aos animais controle. Embora a excreção de creatinina faça parte da função normal dos rins, seu aumento pode ter sido em decorrência da ação miotóxica de BdipTx-I e VBd, já que a creatinina é produto da degradação da creatina presente nas células musculares.

Os mecanismos pelos quais as PLA₂ Lys-49 induzem a nefrotoxicidade ainda não foram devidamente esclarecidos. Mas, a literatura revela que as PLA₂s podem ter efeito citotóxico direto nas células renais, que estaria relacionado com a região C-terminal rica em resíduos de Lys dessas miotoxinas e à liberação de mediadores inflamatórios. Como exemplo, Barbosa e colaboradores (2002) realizaram um estudo com duas PLA₂ de *B. moojeni* (Bmtx-I e Bmtx-II), no qual somente a PLA₂ com estrutura de Lys-49 apresentou atividade nefrotóxica. Já em

estudo realizado por Barbosa e colaboradores (2005) com miotoxinas I e II de *B. jararacussu* (BthTx-I e BthTx-II), foi visto que ambas são nefrotóxicas. Contudo, o bloqueio da ação de BthTx-I pela administração de indometacina, sugere a presença de mediadores lipídicos na nefrotoxicidade induzida por BthTX-I, que é uma PLA₂ Lys-49.

Quanto à lesão renal causada pelo veneno botrópico, de modo geral, está relacionada às alterações hemodinâmicas que acabam induzindo a hipotensão, hipoperfusão e isquemia (REZENDE et al., 1989; SGRIGNOLLI et al., 2011). Também pode haver a coagulação intravascular disseminada, nefrotoxicidade direta atribuída à ação proteolítica do veneno e/ou espasmo dos vasos renais decorrente da indução de substâncias vasoativas pelo veneno (AMARAL et al., 1986; MORAIS et al., 2013). Barbosa e colaboradores (2002), utilizando um modelo de perfusão renal, verificaram que o veneno de *B. moojeni* causa lesão renal evidenciada por diminuições na pressão de perfusão, na resistência vascular renal e no transporte de sódio e potássio, indicando uma lesão tubular. Em outro trabalho semelhante realizado por Souza (2010), observou-se que o veneno de *B. insulares* e suas PLA₂ isoladas, também induziram a nefrotoxicidade em modelos de perfusão em rins isolados e também em cultura de células tubulares renais, com indicativos de morte celular por apoptose.

Em comparação, a insuficiência renal aguda é um dos efeitos mais danosos dos envenenamentos causados por serpentes do gênero *Bothrops* (AMARAL et al., 1986; PATIL et al., 2012). Estudos em vítimas humanas revelam presença de necrose cortical e necrose tubular aguda como as principais causas da insuficiência renal aguda (AMARAL et al., 1986). Experimentos realizados com animais mostram congestão glomerular, degeneração vacuolar de células tubulares, áreas hemorrágicas na medula, degeneração de células tubulares proximais e necrose cortical (CHAVES et al., 1989; CHAVES et al., 1992).

Tomados em conjunto, os dados obtidos fornecem informações adicionais sobre a atividade do veneno de *B. diporus* e mostram pela primeira vez o isolamento das frações fosfolipásicas básicas desse veneno. As avaliações de atividade biológica feitas neste estudo permitiram concluir que a PLA₂ BdipTX-I e o VBd induzem a formação de edema, mitotoxicidade e possíveis alterações na função renal. As ações miotóxica e edematogênica do VBd foram mais acentuadas quando comparadas às de BdipTX-I. Além disso, a dosagem dos marcadores renais aponta

uma possível lesão renal que pode estar relacionada à lesão tubular, devido à proteinúria, que é um dos primeiros indícios dessa alteração. Também verificou-se uma diferenciação na ação do veneno em relação a PLA₂ BdipTX-I, visto que houve uremia induzida por VBd, mas não por BdipTx-I. Esses dados indicam a ação de outras toxinas presentes veneno, como as proteases e LAAO. Contudo, as informações coletadas não permitem concluir que houve alterações cardíacas e hepáticas causadas por BdipTX-I ou VBd no período de tempo avaliado. Estudos adicionais são necessários para delinear um perfil de efeito sistêmico mais detalhado.

A investigação dos mecanismos envolvidos na lesão renal pelas PLA₂ isoladas dos venenos de serpente é de grande importância, visto que estas proteínas estão presentes em grandes quantidades nesses compostos e podem ser responsáveis pelos efeitos sistêmicos, além dos conhecidos efeitos locais. Além disso, pode subsidiar informações que possibilitem minimizar os danos renais, como a insuficiência renal aguda, que é das principais causas de óbito no envenenamento botrópico, constituindo-se assim numa valorosa fonte para estudos posteriores.

6 CONCLUSÕES

- Foram isoladas duas fosfolipases básicas do veneno de *B. diporus*, sendo uma enzimaticamente ativa, possivelmente uma Asp-49, e outra sem atividade enzimática, cuja estrutura primária teve os primeiros 68 resíduos de aminoácidos identificados, confirmando que a proteína pertence à classe das PLA₂ Lys-49. Sendo esta denominada BdipTX-I.
- BdipTX-I e o veneno de *B. diporus* apresentaram atividade edematogênica nas doses testadas (5 e 20 µg/animal), sendo que o efeito de BdipTX-I foi dose-dependente, enquanto que o mesmo não foi observado para o veneno.
- BdipTX-I e o veneno de *B. diporus* apresentaram atividades miotóxicas indicadas pelo aumento nos níveis de CK-total e LDH séricos nos camundongos testados.
- É possível que esteja havendo ação nefrotóxica causada por BdipTX-I e VBd, indicado pela proteinúria causada tanto por VBd quanto por BdipTX-I e pelo aumento dos níveis séricos e urinários de ureia induzidos por VBd.
- O veneno de *B. diporus* teve efeitos mais elevados que BdipTX-I na ação miotóxica, comprovada por uma diferença significativa no aumento de CK-total de VBd em relação a BdipTX-I. Este fato pode estar relacionado a ação dos demais componentes do veneno, principalmente as proteases, o que foi demonstrado pelo aumento da uremia por VBd, mas não por BdipTX-I.
- Os efeitos cardiotóxicos e hepatotóxicos não foram evidentes no tempo estudado, pois não houve aumento da atividade da CK-MB e dos marcadores hepáticos testados somente AST foi alterada.
- Estudos adicionais devem ser realizados para maiores esclarecimentos a respeito do efeito sistêmico induzido por BdipTX-I.

REFERÊNCIAS

- ABREU, A. V.; BELO, C. A. D.; HERNANDES-OLIVEIRA, S. S.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; HYSLOP, S.; FURTADO, M. F. D.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*), **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 148, p. 142-149, 2007.
- ADUKAUSKIENĖ, D.; VARANAUSKIENĖ, E.; A.; ADUKAUSKAITĖ. Venomous Snakebites. Continuing medical education. **Medicina (Kaunas)**, v. 47, p. 461–467, 2011.
- ALPERS, D. H.; DESCHRYVER-KECSKEMETI, K.; GOPDWIN, C. L.; et al, Intestinal alkaline phosphatase in patients with chronic renal failure, **Gastroenterology**, p. 62-94, 1988.
- AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; DA SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R. A.; DOS REIS, R. J.; CARNEIRO, J. G.; CASTRO, J. R. S. Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 28, p. 220-227, 1986.
- AMBROSIO, A. L. B. A.; NONATO, M. C.; DE ARAÚJO, H. S. S.; ARNI, R.; WARD, R. J.; OWNBY, C. L.; SOUZA, D. H. F.; GARRATT, R. C. Molecular mechanism for Lys49-Phospholipase A₂: Activity based on ligand-induced conformational change. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 280, p. 7326–7335, 2005.
- ANDRÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANGULO, Y.; DIAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTÉRRIZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of *Bothropstoxins* from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, p. 755-763, 2000.
- ANGULO, Y.; CHAVES, E.; ALAPE, A.; RUCAVADO, A.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of a myotoxic phospholipase A₂ from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) schlegelii* from Costa Rica. **Arch Biochem Biophys**, v. 15, p. 260-266, 1997.
- APPLE, F. S.; ROGERS, M. A.; SHERMAN, W. M.; COSTILL, D. L.; HAGERMAN, F. C.; IVY, J. L. Profile of creatine kinase isoenzymes in skeletal muscles of marathon runners. **Clin Chem**, v. 30, p. 413-416, 1984.
- ARAYA, C.; LOMONTE, B.; Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A₂ homologues of snake venoms. **Cell Biology International**, v. 31, p. 263-268, 2007.
- ARENAS, J.; DIAZ, G.; LIRAS, E. Activities of creatine kinase and its isoenzyme in serum in various skeletal muscle disorders. **Clin Chem**, v. 34, p. 2460, 1988.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipases A₂: a structural review, **Toxicon**. v. 34, p. 827-841, 1996.

BALSINDE, J.; BALBOA, M. A.; INSEL, P. A.; DENNIS, E. A. Regulation and inhibition of phospholipase A₂. **Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.** v. 39, p.175–189, 1999.

BALSINDE, J.; SHINOHARA, H.; LEFKOWITZ, L. J.; JOHNSON, C. A.; BALBOA, M. A.; DENNIS, E. A.. A group V phospholipase A₂ - dependent induction of cyclooxygenase-2 in macrophages. **J Biol. Chem.**, v. 274, p. 25967-25970, 1999.

BALSINDE, J.; WINSTEAD, M. V.; DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ regulation of arachidonic acid mobilization. **FEBS Letters**. v. 531, p 2-6, 2002.

BARBOSA, A. M.; AMARAL, R. O.; TEIXEIRA, C. F. P.; HYSLOP, S.; COGO, J. C. Pharmacological characterization of mouse hind paw oedema induced by *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, v. 42, p. 515-523, 2003.

BARBOSA, P. S. F.; MARTINS, A. M. C.; HAVT, A.; TOYAMA, D. O.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; FERREIRA, D. P. P.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O.S.; TOYAMA, M. H.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 376-386, 2005.

BARBOSA, P. S. F.; HAVT, A.; FACO, P. E. G.; SOUSA, T.M.; BEZERRA, I. S. A. M.; FONTELES, M. C.; TOYAMAD, M. H.; MARANGONIE, S.; NOVELLOE, J. C.; MONTEIROL, H. S. A. Renal toxicity of *Bothrops moojeni* snake venom and its main myotoxins. **Toxicon**, v. 40, p. 1427–35, 2002.

BERK, P. D. e STUMP, D. D. Mechanisms of cellular uptake of long chain free fatty acids. **Mol. Cell. Biochem.**, v. 192, p. 17–31, 1999.

BERNARDE, P. S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. **Gaz. méd. Bahia**, v. 81, p. 55-63, 2011.

BÉRNILS, R. S. e H. C. COSTA (org.). 2011. **Brazilian reptiles – List of species**. Accessible at <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Captured on 20 set. 2013.

BHAYANA, V.; COHOE, S.; LEUNG, F. Y. Diagnostic evaluation of creatine kinase 2 mass and and creatine kinase 3 and 2 isoform ratios for early diagnosis of acute myocardial infarction. **Clin. Chem.**, v. 39, p. 488, 1993.

BORJA-OLIVEIRA, C. R.; KASSAB, B. H.; SOARES, A. M.; TOYAMA M. H.; GIGLIO, J. R.; MARANGONI, S.; RE, L.; RODRIGUES-SIMIONI, L. Purification and N-terminal sequencing of two presynaptic neurotoxic PLA₂ neuwieditoxin-I and neuwieditoxin-II, from *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Jararaca pintada) venom. **J.venom, anim, Toxicans incl. Trop. Dis.**, v. 13, p. 103-121, 2007.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE - Fundação Nacional de Saúde/ FUNASA. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. 2ª ed. – Brasília 2001.

BRASIL. Portal da Saúde. **Acidentes por animais peçonhentos: Serpentes: Aspectos epidemiológicos**. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31500> Acesso em: 17 de janeiro de 2012.

BURKE, J. E. e DENNIS, E. A. Phospholipase A₂ biochemistry. **Cardiovasc Drugs Ther**, v.23, n. 1, p. 237-242, 2009.

BUSTILLO, S.; LUCERO, H.; LEIVA, L. C.; ACOSTA, O.; KIER JOFFÉ, E. B.; GORODNER, J. O. Cytotoxicity and morphological analysis of cell death induced by *Bothrops* venoms from the northeast of Argentina. **J. Venom Anim Toxins incl Trop Dis**. v.15, p. 28-42, 2009.

CALGAROTTO, A. K.; DAMICO, D. C. S.; PONCE-SOTO, L. A.; BALDASSO, P. A.; SILVA, S. L.; SOUZA, G. H. M. F.; MARANGONI, S. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A₂ BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51, p. 1509– 1519, 2008.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S.; HADDAD, J. V.. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. Ed. Sarvier, 2003.

CARRASCO, P. A.; MATTONI, C. I.; LEYNAUD, G. C.; SCROCCHI, G. J.. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, v. 41, p. 109–124, 2012.

CASTILLO, R. C. Q.; VARGAS, L. J.; SEGURA, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; PÉREZ, J. C. A. In vitro antiplasmodial activity of phospholipases A₂ and a phospholipase homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*, **Toxins**, v. 4, p. 1500-1516, 2012.

CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; BRENES, F. Pathological and biochemical changes induced in mice after intramuscular injection of venom from newborn specimens of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 30, p. 1099–1109, 1992.

CHAVES, F.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; CERDAS, L. Histopathological and biochemical alterations induced by intramuscular injection of *Bothrops asper* (terciopelo) venom in mice. **Toxicon**, v. 27, p. 1085–1093, 1989.

CHAVES, F.; LEON, G.; ALVARADO, V. H.; GUTIÉRREZ, J. M. Pharmacological modulation of edema induced by Lys-49 and Asp-49 myotoxic phospholipases A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 36, p. 1861–1869, 1998.

CHIOATO, L., ARAGÃO, E.A., LOPES FERREIRA, T., MEDEIROS, A.I., FACCIOLI, L.H., WARD, R.J. Mapping of the structural determinants of artificial and biological membrane damaging activities of a Lys49 phospholipase A₂ by scanning alanine mutagenesis. **Biochim. Biophys. Acta.** v. 1768, p. 1247–1257, 2007.

CHIOATO, L. e WARD, R. J.; Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A₂ by sequence analysis and site directed mutagenesis, **Toxicon**, v. 42, p. 869-883, 2003.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, p. 1279-1303, 1991.

CINTRA, A.C.O.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; GIGLIO, J.R. *Bothropstoxin-1*: amino acid sequence and function. **J. Prot. Chem.**, v.12, p.57-64, 1993.

CIRINO, G.; PEERS, S. H.; WALLACE, J. L.; FLOWER, R. J. A study of phospholipase A₂- induced edema in rat paw. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 166: p. 505-510, 1989.

COPUR, S.; KUS, S.; KARS, A.; et al. Lactate dehydrogenase and isoenzymes in serum from patients with multiple myeloma, **Clin Chem**, p. 28-1724, 1999.

CUMMINGS, B. S. Phospholipase A₂ as targets for anti-cancer drugs. **Biochemical pharmacology**, v. 74, p. 949–59, 2007.

DANIELE, J. J.; BIANCO, I. D.; DELGADO, C.; CARRILLO, D. B.; FIDELIO, G. D. A new phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedi* (Yarará Chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**, v. 35, p. 1205-1215, 1997.

DE AZEVEDO, W. F.; WARD, R. J.; GUTIERREZ, J. M.; DIAZ-OREIRO, C.; ARNI, R. K. Crystallization And Preliminary X-Ray Diffraction Analysis Of A Lys49-PLA₂ Homologue From *Cerrophidion Godmani* Venom. **Protein Pept. Lett.** v. 5, 1998.

DEEN, W. M.; BOHRER, M.P; BRENNER, B. M. Macromolecule transport across glomerular capillaries: Application of pore theory. **Kidney Int.**, p. 16-353, 1979.

DEL BRUTO, O. H. e DEL BRUTTO, V. J. NEUROLOGICAL, Neurological complications of venomous snake bites : a review. **Acta Neurol Scand**, p. 363–372, 2012.

DELATORRE, P.; ROCHA, B. A. M.; SNATI-GADELHA, T.; TOYAMA, M.H.; CAVADA, B. S. Cristal structural of Bn IV in complex with myristic acid: A Lys49 myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi* venom. **Biochimie**, v. 93, p. 513-518, 201.

DENG, J. T.; HOYLAERTS, M. F.; VAN HOOFF, V. O.; et al. Differential release of human intestinal alkaline phosphatase in duodenal fluid and serum. **Clin Chem**, p. 38-2532, 1992.

DENNIS, E. A. Regulation of eicosanóides production: role of phospholipases and inhibitors. **Biotechnolgy**, v. 5, p. 1294-1300, 1987.

DENNIS, E. A. e WINSTEAD, M. V. Calcium-independent phospholipase A₂: structure and function. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 28–39, 2000.

DENNIS, Edward A. Diversity of groups types, relation, and function of phospholipase A₂. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 13057-13060, 1994.

DIAS, L.; RODRIGUES, M. A. P.; SMAAL, A.; RENNO, A. L.; MELLO, S. M.; MORENO JR., H.; HYSLOPL, S. Cardiovascular responses to *Bothrops alternatus* (Urutu) snake venom in anesthetized dogs. **Cardiovascular toxicology**, v. 12, p. 243–57, 2012.

EVANGELISTA, I. L.; MARTINS, A. M. C.; NASCIMENTO, N. R. F.; HAVT, A.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; NORÕES, T. B. S.; TOYAMA, M. H.; DIZ-FILHO, E. B.; TOYAMA, D. O.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Renal and cardiovascular effect of *Bothrops marajoensis* venom and phospholipase A₂. **Toxicon**, v. 55, p. 1061-1070, 2010.

FAN, C.; QIAN, Y.; YANG, S.; GONG, Y. cDNA cloning and sequence analysis of Lys-49 Phospholipase A₂ from *Agkistrodon acutus*. **Genet. Anal. Tech. Appl.** v. 15, p. 15-18, 1999.

FENWICK, A. M.; GUTBERLET, R. L.; EVANS, J. A.; PARKINSON, C. L.. Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). **Zoological Journal of the Linnean Society**, v.156, p. 617–640, 2009.

FERREIRA, T. L.; WARD, R. J. The interaction of Bothropstoxin-I (Lys49-PLA(2)) with liposome membranes. **Toxicon**, v. 54, n. 4, p. 525–30, 15 set. 2009.

FINN, W. F. Diagnosis and management of acute tubular necrosis, **Med Clin North Am**, p. 74- 873, 1990.

FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; FERNANDES, A. C.; SILVA, R. J.; GIGLIO, J. R.;. Crystallization and preliminary X-ray difraction analysis of a myotoxic phospholipase A₂ homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1432, p. 393–395, 1999.

FURLAN, Maria Estella. **Caracterização do precursor e da atividade de inibição da agregação plaquetária da BnP1 e de desintegrinas do veneno de *Bothrops newwiedi***. 2010. 28f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Programa de Pós-graduação Interunidades e Biotecnologia/USP/Instituto Butantan/IPT, São Paulo.

GAMA, Ana Paula de Aragão. **Envenenamento experimental por *Bothrops jararaca* e *B. jararacussu* em ovinos: aspectos clínico-patológicos e laboratoriais**. 2009. 98 f.: EM, C. D. E. P. et al. Envenenamento Experimental por *Bothrops*. 2009. Dissertação (mestrado) – Mestre em Ciências, no Curso de Pós-

Graduação em Ciências Veterinárias, Área de Concentração em Sanidade Animal Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias. Rio de Janeiro-RJ.

GASPAI, F.; PERICO, N.; REMUZZI G. Measurement of glomerular filtration rate. **Kidney Int Suppl**, p. 63-151, 1997.

GAY, C. C.; LEIVA, L. C.; MARUN, S. Proteolytic , edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**, v. 46, p. 546–554, 2005.

GIANNOTTI, K. C.; LEIGUEZ, E.; MOREIRA, V.; NASCIMENTO, N. G.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MELO, R. L.; TEIXEIRA, C. A Lys49 phospholipase A₂, isolated from *Bothrops asper* snake venom, induces lipid droplet formation in macrophages which depends on distinct signaling pathways and the C-Terminal region. **BioMed Research International**, v. 2013, 2013.

GRAY WR. End group analysis using dansyl chloride. **Methods Enzymol**, v. 25B, n.121, 1972

GUDER, W. G.; HOFFMAN, W. Markers for diagnosis and monitoring of renal tubular lesions, **Clin Nephrol**, p. 38-53, 1992.

GUTIÉRREZ, J. M.; WILLIAMS, D.; FANC, H. W., WARRELL, D. A. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **Lancet**, v. 375, p. 89–91, 2 jan. 2010.

GUTIÉRREZ, J. M.; AVILA, C.; ROJAS, E.; CERDAS, L. Alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, v. 26, p. 411–413, 1988.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 976–987, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms: a review. **Mem Inst Butantan**, v. 51, p. 211-223., 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; LEMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini, R.M. (Ed.), *Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function and Mechanism*. **Wiley, Chichester**, p. 321–352. 1997.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A₂: unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**. 2012.

GUTIÉRREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 915–31, 15 dez. 2003.

GUTIERREZ, J. M.; OWNBY, C. L.; ODELL, G. V. Isolation of a myotoxin from *Bothrops asper* venom: partial characterization and action on skeletal muscle. **Toxicon**, v. 22, p. 115-128, 1984.

GUTIÉRREZ, J. M.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A₂: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA₂ homologue, **Toxicon**, v. 51, p. 80-92, 2008.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D. G.; WARRELL, D. A. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. **PLoS Medicine**. v. 3, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M.; WARRELL, D. A.; WILLIAMS, D. J.; JENSEN, S.; BROWN, N.; CALVETE, J. J.; HARRISON, R. A. The Need for Full Integration of Snakebite Envenoming within a Global Strategy to Combat the Neglected Tropical Diseases: The Way Forward. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. v. 7, 2013.

GUTIERREZ, J.M., LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, p. 1405–1424, 1995

HARRIS, J. B.; GRUBB, B. D.; MALTIN, C. A.; DIXON, R... The neurotoxicity of the venom phospholipases A₂, notexin and taipoxin. **Exp. Neurol**, v. 161, p. 517–526, 2000.

HOLZER, M., MACKESSY, S.P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂, **Toxicon**, v. 34, p. 1149– 1155, 1996.

HUANCAHUIRE-VEGA, S. et al. Biochemical and pharmacological characterization of PhTX-I a new myotoxic phospholipase A₂ isolated from *Porthidium hyoprora* snake venom. Comparative biochemistry and physiology. **Toxicology e pharmacology: CBP**, v. 154, n. 2, p. 108–19, ago. 2011.

IZIDORO, L. F. M.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES, R. S.; FERRO, E. V.; HAMAGUCHI, A.; GIGLIO, J. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.. Neutralization of some hematological and hemostatic alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, by the aqueous extract from *Casearia marikuitensis* (Flacourtiaceae). **Biochimie**, v. 85, p. 669–675, 2003.

JANSSEN, M. J.; VAN DE WIEL, W. A. E. C.; BEIBOER, S. H. W.; VAN KAMPEN, M. D.; VERHEIJ, H. M.; SLOTBOOM, A. J.; EGMOND, M. R. Catalytic role of the active site histidine of porcine pancreatic phospholipase A₂ probed by the variants H48Q, H48N and H48K. **Protein engineering**, v. 12, p. 497–503, 1999.

JARRAR, B. M. Histological alterations and biochemical changes in the liver of sheep following *Echis coloratus* envenomation. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 18, p. 169–174, 2011.

JOHNSON, R. D.; O'CONNOR, M. L.; KERR, R. M. Extreme serum elevations of aspartate aminotransferase, **Am J Gastroenterol**, 90: 1244-1245, 1995.

KIM, N. K.; YASMINEH, W. G.; FREIR, E. F.; et al. Value of alkaline phosphatase, 5'nucleotidase, gamma glutamyltransferase, and glutamate dehydrogenase activity measurements (single and combined) in serum in diagnosis of metastasis to the liver. **Clin Chem**, p. 23-2034, 1997.

KINI, R. M. e EVANS H.J.. Correlation between the enzymatic activity, anticoagulant and antiplatelet effects of phospholipase A₂ isoenzymes from *Naja nigricollis* venom. **Thromb Haemost.** v. 31, p. 62-173, 1988.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism. **Biochem J.** v. 387, p. 377–387, 2006.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827-840, 2003.

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A₂ enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, p. 1147–1161, 15 jun. 2005.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 27, p. 613–635, jan. 1989.

LAEMMILI, U .K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. **Nature**, v. 227. p.680- 685, 1970.

LAMBEAU, G.; ANCIAN, P.; BARHANIN, J.; LAZDUNSKI, M. Cloning and expression of a membrane receptor for secretory phospholipases A₂. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 1575-1576, 1994.

LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. **TIPS**, v. 20, 1999.

LAMBEAU, G.; SCHMID-ALLIANA, A.; LAZDUNSKI, M. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A₂ in skeletal muscle . **J. boil. Chem.**, v. 265, p. 9526-9532, 1990.

LEITE, V. L.; ANDRADE, M. F.; LÚCIA, M.; GOUVÊA, C. M. C. P. Método para isolamento da fração miotóxica do veneno de *Bothrops neuwied* e avaliação de sua atividade. **R. Un. Alfenas, Alfenas**. v. 5. p. 63-68, 1999.

LIU, C. S.; CHEN, J. M.; CHANG, C. H.; CHEN, S. W.; TENG, C. M.; TSAI, I. H. The amino acid sequence and properties of an edema-inducing Lys-49 phospholipase A₂ homolog from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus*. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1077, p. 362-370; 1991.

LIU, Q.; HUANG, Q.; TENG, M.; WEEKS, C. M.; JELSCH, C.; ZHANG, R.; NIU, L. The crystal structure of a novel, inactive, lysine 49 PLA₂ from *Agkistrodon acutus*

venom: an ultrahigh resolution, AB initio structure determination. **J. Biol. Chem.** v. 278, p. 41400-41408, 2003.

LIU, S. Y.; YOSHIZUMI, K.; ODA, N.; OHNO, M.; TOKUNAGA, F.; IWANAGA, S.; KIHARA, H. Purification and amino acid sequence of basic protein II, a lysine-49-phospholipase A₂ with low activity, from *Trimeresurus flavoviridis* venom. **J. Biochem.** v. 107, p. 400-408, 1990.

LIZANO, S.; LAMBEAU, G.; LAZDUNSKI, M. Cloning and cDNA sequence analysis of Lys(49) and Asp(49) basic phospholipase A₂ myotoxin isoforms from *Bothrops asper*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** v. 33, p. 127-132, 2001.

LOMONTE, B.; MORENO, E.; TARKOWSKI, A.; HANSON, L. Neutralizing interaction between heparins and meras, in which resistance or susceptibility depended upon the myotoxin II, a Lys49 phospholipase A₂ from *Bothrops asper* Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J. Biol. Chem.** v. 269, 29867-29873, 1994.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARÍA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115–129 in Lys49 myotoxic phospholipases A₂ from snake venoms. **Toxicon**, v. 42, p. 307–312, set. 2003.

LOMONTE, B.; PIZARRO-CERDA, J.; ANGULO, Y.; GORVEL, J. P.; MORENO, E. Tyr-->Trp- substituted peptide 115-129 of a Lys49 phospholipase A₂ expresses enhanced membrane-damaging activities and reproduces its in vivo myotoxic effect. **Biochim Biophys Acta**, v. 1461, p. 19-26, 1999.

LOMONTE, B. e GUTIERREZ, J. M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 27, p. 725-733, 1989.

LOPES, D. S.; BALDO, C.; OLIVEIRA, C. F.; ALCÂNTARA, T. M. de; OLIVEIRA, J. D. D.; GOULART, L. R.; HAMAGUCHI, A.; HOMIS-BRANDEBURGO, M. I.; MOURA-DA-SILVA, A. M.; CLISSA, P. B.; RODRIGUES, V. M.. Characterization of inflammatory reaction induced by neuwiedase, a P-I metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* venom. **Toxicon**, v. 54, p. 42–49, 2009.

MACKESSY, P. e HOLZER, M. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A₂. **Toxicon**, v. 34, p. 1149-1155, 1996.

MARAGANORE, J. M. e HEINRIKSON, R. L. The lysine-49 phospholipase A₂ from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. Relation of structure and function to other phospholipases A₂. **J Biol Chem.** v. 15; p. 797-804. 1986.

MARAGONORE, J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHESF, W.; KEZDY, R. J.; HEINRIKSON, R. L. A New Class of Phospholipases A₂ with Lysine in Place of Aspartate-49: Functional consequences for calcium and substrat binding. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 259, p. 13639-13843, 1984.

MARANGONI, F. A.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LANDUCCI, E. C. T. Unmasking snake venom of *Bothrops leucurus*: purification and pharmacological and structural characterization of new PLA₂ Bleu TX-III, **BioMed Research International**, 2013.

MATSUI, T.; FIJURAMA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affectin hemostasis and thrombosis. **Biochim. Biophys. Acta**, 1477, 146-156, 2000.

MINOLI, I.; ÁLVARES, D. J.; AVILA, L. J. New records and geographic distribution map of *Bothropoides diporus* Cope , 1862 (Reptilia : Viperidae). **Check List**, v. 7, p. 608–609, 2011.

MORAIS, I. C. O.; TORRES, A. F. C.; PEREIRA, G. J. S.; PEREIRA, T. P.; MENEZESA, R. R. P. P. B.; MELLO, C. P.; JORGE, A. R. C.; BINDÁ, A. H.; TOYAMA, M. H.; MONTEIRO, H. S. A.; SMAILI, S. S.; MARTINS, A. M. C. *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon**, v. 61, p. 38–46, 2013.

MOUSSVIAN, S. N.; BECKER, R. C.; PIEPMAYER, J. L; et al. Serum gamma-glutamyl transpeptidase and chronic alcoholism-influence of alcohol ingestion and liver disease. **Dig Dis Sci**, v. 30, p. 211-214, 1997.

MURAKAMI, T.; KARIU, T.; TAKAZAKI, S.; HATTORI, S.; CHIJIWA, T.; OHNO, M.; ODA-UEDA, N. Island specific expression of a novel Lys-49-phospholipase A₂ (BP111) in *ProtoBothrops flavoviridis* venom in Amami-Oshima, Japan. **Toxicon**. v. 15; p. 399-407, 2009.

MURAKAMI, M.; TAKETOMI, Y.; SATO, H.; YANANOTO, K. Secreted phospholipase A₂ revisited, **J. Biochem**, v. 150, p. 233-255, 2011.

NEMENSANZKY, E.; LOTT, J. A. Gamma-glutamyltransferase and its isoenzymes: progress and problems. **Clin Chem**, v. 31, 797-803, 1985.

NUNEZ, C. E.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Identification of the myotoxic site of the Lys49 phospholipase A₂ from *Agkistrodon piscivorus piscivorus* snake venom: synthetic C- terminal peptides from Lys49, but not from Asp49 myotoxins, exert membrane-damaging activities. **Toxicon**, v. 39, p. 1587-94, 2001.

OLIVEIRA, C.Z.; MENALDO, D.L.; STÁBELI, R.G.; SOARES, A.M. An γ-type phospholipase A₂ inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: Structural and functional characterization. 2009.

OLIVEIRA, V. C.; LANARI, L. C.; HAJOS, S. E.; ROODT, A. R. Toxicity of *Bothrops neuwiedi* complex (“yará chica”) venom from different regions of Argentina (Serpents, Viperidae), **Toxicon**, v. 57, p. 680 – 685, 2011.

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**. v. 37, p. 411–445, 1999.

OMS-Organização Mundial de Saúde/WHO – World Health Organization/ Programmes and projects/ Neglected tropical diseases/ Snakebite. Disponível em: http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/index.html. Acessado em: 01/01/2012.

PATIL, E. Snake Bite Induced Acute Renal Failure : A Study of Clinical Profile and Predictors of Poor Outcome. **World J Nephrol Urol**, v. 1, n. 9, p. 59–65, 2012.

PEICHOTO, M. E.; TEIBLER, P.; RUIZ, R.; LEIVA, L.; ACOSTA, O. Systemic pathological alterations caused by *Philodryas patagoniensis* colubrid snake venom in rats. **Toxicon**, v. 48, p. 502-528, 2006.

PÉREZ, A. V.; SARAIVA, P.; RUCAVADO, A.; SANT'ANA, C. D.; SOARES, A. M.; GUTIÉRREZ, M. J. Local and systemic pathophysiological alterations induced by a serine proteinase from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 49, p. 1063-1069, 2007.

PÉREZ, O. C. A.; KOSCINCZUK, P.; TEIBLER, P.; NEGRETTE, M. S.; RUIZ, R.; MARUÑAK, S.; BOGARÍN, G. Actividades hemorrágica y edematizante y alteraciones histológicas em almohadilla plantar del ratón inducidas por venenos de serpientes de los gêneros *Brothrops* y *Crotalus* de argentina. **Toxicon**, v. 36, p. 1165 – 1172, 1998.

PONCE-SOTO, L. A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, M. J.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A₂ homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1770, p. 585 – 593, 2007.

PONCE-SOTO, L. A.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S. Neurotoxic, myotoxic and cytolytic activities of the new basic PLA₂ isoofrms BmjeTX-I and BmjeTX-II isolated from the *Bothrops marajoensis* (Marajó Lancehead) snake venom. **Protein J**, v. 29, p. 103-113, 2010.

QUARTINO, P. J. Y.; BARRA, J. L.; FIDELIO, G. D.. Cloning and functional expression of secreted phospholipases A₂ 3 from *Bothrops diporus* (Yarará Chica). **Biochem. Biophys. Res. Commun**, 2012.

QUEIROZ, G. P.; PESSOA, L. A.; PORTARO, F. C. V.; FURTADO, M. F. D.; TAMBOURGI, D. V.; Interespecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from *Bothrops* genu. **Phyllomedusa**. v. 7, p. 45-90, 2008.

RAHN, K. H.; HEINDEREICH, S.; BRUCKNER, D. How to assess glomerular function of the renal damage in humans. **J Hypertens**, p. 17-309, 1999.

RANDAZZO-MOURA, P.; PONCE-SOUTO, L. A.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARAGONI, S.; Structural characterization and neuromuscular activity of a new Lys49 phospholipase A₂ homologous (Bp-12) isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Protein J**, v. 27, p.355-362, 2008.

REZENDE, N. A.; AMARAL, C. F. S.; BAMBIRRA, E. A.; LACHATT, J. J.; COIMBRA, T. M. Functional and histopathological renal changes induced in rats by *Bothrops jararaca* venom. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 22, 407–416, 1989.

RIBEIRO, L. A.; JORGE, M. T. Epidemiologia e quadro clínico dos acidentes por serpentes *Bothrops jararaca* adultas e filhotes. **Ver. Inst. Méd. Trop.** v. 32, p. 436-442, 1990.

RODRIGUES, R.; SILVA, J.; FRANÇA, J. B.; FONSECA, F. P.P.; OTAVIANO, A. R.; SILVA, F. H.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S.; SANTOS, J. I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTE, M. R. M.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochime**, v. 91, p.490-501, 2009.

RODRIGUES, V. M.; MARCUSSI, S.; CAMBRAIA, R. S.; ARAÚJO, A. L.; MALTA-NETO, N. R.; HAMAGUCHI, A.; FERRO, E. A. V.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GILGIO, J. R.; SOARES, A. M. Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipase A₂ from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom, **Toxicon**, v. 44, p. 305-314, 2004.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C. N.; BELETTI, M. E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M.. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 908–917, 2008.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

SCHUREK, H. J. Mechanisms of glomerular proteinuria and hematuria. **Kidney Int**, p. 47-S12, 1994.

SETÚBAL, S. S.; PONTES, A. S.; FURTADO, J. L.; XAVIER, C. V.; SILVA, F. L.; KAYANO, A. M.; IZIDORO, L. F. M.; SOARES, A. M.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; ZULIANI, J. P. Action of Two Phospholipases A₂ Purified from *Bothrops alternatus* Snake Venom on Macrophages. **Biochemistry (Moscow)**, v. 78, p. 194–203, 2013.

SGRIGNOLLI, L. R.; MENDES, G. E. F.; CARLOS, C. P.; BURDMANN, E. A. Acute Kidney Injury Caused by *Bothrops* Snake Venom. **Nephron. Clin. Pract.** v. 119, p. 131– 137, 2011.

SHASHIDHARAMURTHY, R.; MAHADESWARASWAMY, Y. H.; RAGUPATHI, L.; VISHWANATH, B. S.; KEMPARAJU, K. S. Systemic pathological effects induced by cobra (*Naja naja*) venom from geographically distinct origins of Indian peninsula. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 62, p. 587-592, 2010.

SHET, S. G.; GLAMM, S. L.; GORDON, F. D.; AST/ALT ratio predicts cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection. **Am J Epidemiol**, v. 93, p. 44-48, 1998.

SHIHABI, Z. K.; KONEN, J. C.; O'CONNOR, M. L. Albuminuria vs urinarytotal protein for detecting chronic renal disorders. **Clin Chem**, p. 37-621, 1991.

SILVA, A. GUNAWARDENA, P.; WEILGAMA, D.; MADUWAGE, K.; GAWARAMMANA, I. Comparative in-vivo toxicity of venoms from South Asian hump-nosed *pit vipers* (Viperidae : Crotalinae : Hypnale). **BMC Research Notes**, v. 5, n. 1, p. 1, 2012.

SILVA, V. X. The *Bothrops neuwiedi* complex. In: CAMPBELL, J.A., LAMAR, W.W. (Eds.), **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Cornell University Press, Ithaca, New York, v. 2, p. 410–422, 2004.

SILVA, Vinícius Xavier da e RODRIGUES, Miguel Trefaut. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, v. 7, p. 45-90, 2008.

SINGER, A. J.; CARRACIO, T. R.; MOFENSON, H.C. The temporal profile of increased transaminase levels in patients with acetaminophen-induced liver dysfunction. **Ann Emerg Med**, v. 26, p. 49-53, 1995.

SINGH, B. S.; ARMUGAM, A.; KINI, R. M.; JEYASEELAN, K. Phospholipase A₂ with platelet aggregation inhibitor activity from *Austrelaps superbis* venom: protein purification and cDNA cloning. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 375, p. 289-303, 2000.

SINGH, N.; KUMARAY, R. P.; KUMARA, S.; SHARMA, S.; MIRA, R.; KAURA, P.; SRINIVASANA A.; SINGH T. P. Simultaneous inhibition of anti-coagulation and inflammation: crystal structure of phospholipase A₂ complexed with indomethacin at 1.4 Å resolution reveals the presence of the new common ligand-binding site. **Journal of molecular recognition : JMR**, v. 22, p. 437–45, 2009.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochimica and Biophysica Acta**, v. 1488, p.1-19, 2000.

SOARES, A. M.; FONTES, M. R. R.; GIGLIO, J. R.. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Curr Org Chem**, v. 8, p. 1-14, 2004.

SOARES, A. M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; RODRIGUES, V. M.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; RODRIGUES, V.; FONTES, M. R. M.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R.. Structural and Functional Characterization of BnSP-7, a Lys49 Myotoxic Phospholipase A₂ Homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, p. 201–209, 2000.

SOARES, A. M.; OLIVEIRA, C. Z.; SANT'ANA, C. D.; MENALDO, D. L.; SILVEIRA L. B.; TEIXEIRA, S. S.; RUEDA, A. Q.; MARCUSSI, S. Professor José Roberto Giglio and toxinology in Brazil: 48 years in research. **Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.** v. 13, p.711-728, 2007.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMIS-BRANDEBURGO, M. I.; TOYAMA, M. H.; LOMBARDI, F. R.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. A rapid procedure for isolation of the Lys-49 myotoxin-II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v. 36, p. 503-514, 1998.

SOUZA, C. A. T.; Kayano, A. M.; Setúbal, S. S.; Pontes, A. S.; Furtado, J. L.; Kwasniewski, F. H.; Zaqueo, K. D.; Soares, A. M.; Stábeli, R. G.; Zuliani, J. P. Local and systemic biochemical alterations induced by *Bothrops atrox* snake venom in mice. **J Venom Res**, v. 3, p. 28–34, 2012.

SRIBAR, J.; KRIZAJ, I. Secreted phospholipases A₂: not just enzymes, **Acta Chim. Slov.**, v. 58, p. 678-688, 2011.

SUN, M. Z.; GUO, C.; TIAN, Y.; CHEN, D.; GREENAWAY, F. T.; LIU, S. Biochemical, functional and structural characterization of Akbu-LAAO: a novel snake venom L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis*. **Biochimie**, v. 92, p. 343–349, 2010.

TONELLO, F.; SIMONATO, M.; AITA, A.; PIZZO, P.; FERNÁNDEZ, J.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MONTECUCCO, C. A Lys-49-PLA₂ myotoxin of *Bothrops asper* triggers a rapid death of macrophages that involves autocrine purinergic receptor signaling. **Cell Death and Disease**, v. 3, 2012.

TOYAMA, D. O.; FILHO, E. B. S. D.; CAVADA, B. S.; ROCHA, B. A. M.; OLIVEIRA, S. C. B.; COTRIM, C. A.; SOARES, V. C. G.; DELATORRE, S. M.; TOYAMA, M. H. Umbelliferone induces changes in the structure and pharmacological activities of Bn IV, a phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedi*, **Toxicon**, v. 57 p. 851-860, 2011.

TSAI, I. H.; CHEN, Y. H.; WANG, Y. M.; TU, M. C.; TU, A. T. Purification, sequencing, and phylogenetic analyses of novel Lys-49 phospholipases A₂ from the venoms of rattlesnakes and other pit vipers. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 394, n. 2, p. 236-244, 2001.

TU, A. T. Overview of snake venom chemistry. **Adv. Exp. Med. Biol.** 391, p. 37-62, 1996. In: MATSUI, T. Y.; FUJIMURA, et al. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1477, p. 146-156. 2000.

WARD, R. J.; CHIOATO L.; OLIVEIRA, A. H. C.; RULLER R.; SA, J. M.. Active-site mutagenesis of a Lys 49 -phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochem. J**, v. 96, p. 89–96, 2002.

WARRELL, D. A. **Snakebites in Central and South America: Epidemiology, clinical features and clinical management.** In J. A. Campbell e W. W. Lamar

(Eds.), *Venomous reptiles of the Western Hemisphere* (Vol. 2, pp. 709–761). Ithaca, NY: Comstock Publishing Associates/Cornell University Press 2004.

WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77–88, 2 jan. 2010.

WILLIAMS, D. et al. Snakebite envenoming from a global perspective : Towards an integrated approach. **Toxicon**, v. 56, p. 1223–1235, 2010.

ZOUARI-KESSENTINI, R.; SRAIRI-ABID, N.; BAZAA, A.; EL AYEB, M.; LUIS, J.; MARAKCHI, N. Antitumoral potential of Tunisian snake venoms secreted phospholipases A₂. **Biomed Research International**, 2013.

ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. M.; ZAMUNER, S. R.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. F. P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A₂ isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. **Toxicon**, v. 45, p. 335-346, 2005a.

ZULIANI, J. P.; GUTIÉRREZ, J. M.; CASAIS E SILVA, L. L.; SAMPAIO, S. C.; LOMONTE, B.; TEIXEIRA, C. F. P. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 46, n. 5, p. 523-532. 2005b.

ZYCHAR, B. C.; DALE, C. S.; DEMARCHI, D. S.; GONÇALVES, L. R. C. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A₂ to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**, v. 55, n. 2-3, p. 227–234, 2010.